

Marcy das Graças Fonseca

**Estudo da ecologia química da broca-da-erva-mate,
Hedypathes betulinus (Klug, 1825) (Coleoptera:
Cerambycidae: Lamiinae)**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Entomologia, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Paulo H. G. Zarbin

Curitiba
2010

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o mistério passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rita Fonseca pelo o amor, confiança e dedicação e Geraldo Fonseca (in memoriam), que certamente de muitas maneiras acompanha e abençoa minha vida.

Aos meus queridos irmãos, Márcia, Marcília, Zé, Rogério, Márcio, Maly e Magaly pelo carinho, amizade e incentivo em todos os momentos. Às minhas irmãs, em especial, pelos telefonemas e apoio incondicional nos momentos mais difíceis. Obrigada por estarem sempre ao meu lado. Amo vocês!!

Ao meu orientador Paulo Henrique G. Zarbin, pela amizade, pela confiança e pelos conhecimentos transmitidos no decorrer destes 4 anos...Muito obrigada!!!

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os Professores do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Entomologia da Universidade Federal do Paraná, pelo entusiasmo de ensinar, pela atenção aos alunos e pela oportunidade da realização do doutorado.

Ao Clóvis Büttgenbender, da empresa VIER, por permitir a coleta dos insetos em suas plantações durante toda a pesquisa. Além do apoio de seus funcionários durante todas as coletas. Ao José e Gessi, em especial, pela atenção e carinho e por estarem sempre dispostos a me receber nos dias de coleta.

Aos pesquisadores Marcílio José Thomazini, Susete Penteado da Embrapa Floresta pela ajuda no planejamento e instalação dos experimentos de campo. Ao Edson Tadeu, por permitir coleta de material nas áreas de erva-mate da Embrapa.

À Regina do laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da UFPR, pela ajuda indispensável na preparação dos materiais para análise microscópica.

Às minhas eternas amigas Miryan e Bianca pela ajuda indispensável à realização deste trabalho, pela amizade, apoio e pelos momentos divertidíssimos que passamos juntas... E que não foram poucos!!!

Aos meus amigos do Laboratório de Semioquímicos, Angela, Mauro, Carla, Camila, Rafael, Irineu, Vanusa pelo apoio na realização deste trabalho e pela agradável convivência.

Ao Diogo pela elaboração da síntese orgânica dos compostos feromonais e me ajudar muito na parte química.

Aos colegas do curso de Entomologia pelo companheirismo.

Às minhas amigas de república Sabina e Nayara pela amizade e compreensão. À Sabina em especial, pela ajuda constante no inglês, pelo carinho, pelas conversas agradáveis e alegres durante esses 4 anos de convivência.

À Deus, pela vida e pela força nos momentos de dificuldade.

A todos que de alguma forma ou de outra contribuíram para que eu atingisse meu objetivo.

BIOGRAFIA

Marcy das Graças Fonseca, filha de Geraldo Eládio da Fonseca e Rita Barreto Fonseca, natural de Bias Fortes, MG.

Em janeiro de 2004, concluiu o curso de Eng. Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

Em Fevereiro de 2006, concluiu o curso de mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

Em março de 2006, ingressou no curso de doutorado em Entomologia na Universidade Federal do Paraná, submetendo-se para defesa de tese em 2 de março de 2010.

SUMÁRIO

RESUMO.....	Página Viii
ABSTRACT.....	X
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13

Capítulo I: Comportamento de acasalamento e evidência de feromônios

sexo específicos de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera:

Cerambycidae: Lamiinae)..... 22

RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

Capítulo II: Feromônio sexual produzido pelos machos de *Hedypathes*

***betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae):**

Identificação estrutural, dinâmica de produção e atividade biológica.....	46
RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48

INTRODUÇÃO.....	49
MATERIAL E MÉTODOS.....	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

Capítulo III: Localização das glândulas de produção e estudo da biossíntese do feromônio sexual do macho de <i>Hedypathes betulinus</i> (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae).....	78
---	-----------

RESUMO.....	79
ABSTRACT.....	80
INTRODUÇÃO.....	81
MATERIAL E MÉTODOS.....	82
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
CONCLUSÕES GERAIS.....	101

Estudo da ecologia química da broca-da-erva-mate, *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae)

RESUMO

Os objetivos desta pesquisa foram avaliar a sequência de acasalamento e a evidência do feromônio produzido pelos adultos de *Hedypathes betulinus*; identificar os compostos macho-específicos e a avaliar a atividade biológica dos compostos sintéticos sozinhos ou combinados com voláteis da planta hospedeira; e localizar as glândulas produtoras do feromônio sexual do macho e estudar a biossíntese do feromônio. A sequência do comportamento de acasalamento demonstra que o reconhecimento dos machos pelas fêmeas pode ser mediado por um feromônio macho-específico, e que os machos reconhecem as fêmeas por um feromônio de contato. Respostas comportamentais de machos e fêmeas de *H. betulinus* em olfatômetro em Y para voláteis liberados por machos e fêmeas confirmaram a presença de um feromônio macho-específico, uma vez que fêmeas foram significativamente atraídas para extratos de machos. Em arena plástica, 70% dos machos tentaram acasalar com fêmeas mortas lavadas e tratadas com extrato, sugerindo que os extratos continham feromônio de contato. Análises em cromatografia gasosa (CG) dos voláteis liberados de machos e fêmeas mostraram a existência de três compostos macho-específicos, nas proporções de 91,40: 7,90: 0,70. Esses compostos foram identificados como sendo o acetato de (*R*)-(-)-(*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ila (majoritário), a (*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona, geranil acetona e o (*R*)-(-)-(*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ol (minoritários). As fêmeas foram atraídas para o composto majoritário sintético racêmico combinado com voláteis da planta hospedeira ou para a mistura ternária racêmica, combinada ou não com voláteis da planta hospedeira, abrindo perspectiva para o emprego de feromônio no

manejo integrado de *H. betulinus* em erva-mate. A biossíntese do feromônio do macho se dá em glândulas localizada no protórax e o mesmo parece ser liberado por pequenos poros cuticulares distribuídos por todo o protórax. Usando precursor deuterado, foi demonstrado que o componente principal do feromônio sexual de *H. betulinus* é biossintetizado a partir da geranil acetona. Os resultados obtidos neste trabalho deram início ao estudo da ecologia química da broca-da-erva-mate, *H. betulinus*.

Chemical ecology study of *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae)

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the mating behavior and the evidence of pheromone produced by *Hedypathes betulinus*; to identify male-specific compounds and the biological activity of synthetic compounds alone or combined with host plant volatiles; and determine the location of male sex pheromone glands and study the pheromone biosynthesis. The mating behavior shows that male recognition by females may be mediated by a male-produced pheromone, and that males recognize females by contact pheromone. Behavioral responses of *H. betulinus* male and female in Y-olfactometer to volatiles released from males and females confirmed the presence of a male-specific pheromone, since females were significantly attracted to male extracts. In plastic arena, 70% of males attempted to mate with dead-washed extract-treated females, suggesting that these extracts contained contact pheromones. Analysis of male and female volatiles by gas chromatography (GC) showed the presence of three male-specific compounds, at a ratio of 91.40: 7.90: 0.70. These compounds were identified as a (*R*)-(-)-(*E*) -6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-acetate (majoritary), (*E*)-6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-one (geranylacetone) and (*R*)-(-)-(*E*)-6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-ol (minors). Females were attracted to the racemic majority compound combined with volatile host plant or to the ternary racemic mixture combined or not with host plant volatiles. These findings opened a new perspective to pheromone employment in the integrated management of *H. betulinus* in yerba mate. Pheromone biosynthesis occurs in glands locate in the prothorax and appears to be released by small pores distributed through the prothorax. By using deuterated precursors it was demonstrated

that the main pheromone component of *H. betulinus* is biosynthesized from geranyl acetone. These results represent initial studies about the chemical ecology of *H. betulinus*.

INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire, 1920) (Aquifoliaceae) é nativa da América do Sul, estando distribuída em uma área de aproximadamente 540.000 km², compreendendo territórios do Brasil, Paraguai e Argentina. No Brasil a erva-mate corresponde a 450.000 km², abrangendo a região centro norte do Rio Grande do Sul, o estado de Santa Catarina e centro-sul do Paraná, representando cerca de 5% do território nacional (Oliveira & Rotta 2005).

No Brasil, a exploração da erva-mate constitui numa atividade de grande importância, tanto do ponto de vista econômico quanto social. Seu cultivo é feito em cerca de 180 mil propriedades rurais em 596 municípios no sul do Brasil, gerando mais de 710 mil empregos diretos constituindo-se numa das poucas opções de emprego e renda no meio rural, principalmente nos meses de junho, julho e agosto, época da colheita. Além de ser a principal atividade econômica de muitos pequenos produtores e municípios, rende diretamente mais de R\$ 175 milhões anuais (Embrapa 2005).

A produção brasileira de erva-mate cancheada foi de 219,7 mil toneladas em 2008, sendo o estado do Paraná o maior produtor de erva-mate do Brasil, representando quase 50% da produção nacional. Cabe ressaltar o crescimento na produção ocorrido nos últimos dez anos no Paraná, onde a erva-mate cancheada passou de 104,8 mil toneladas em 1998, para 154,7 mil toneladas em 2008, com um aumento de 47,6% (IBGE 2008).

No início da década de 1970 houve um aumento da área plantada em sistema de monocultura e a eliminação de florestas nativas, que são abrigo dos inimigos naturais, propiciando um ambiente favorável para o aumento populacional de insetos fitófagos (Iede 1985, Penteadó 1995). Foram identificadas 86 espécies de insetos que se alimentam de diferentes partes da erva-mate (Iede & Machado 1989). Contudo, as espécies

consideradas pragas são: *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae), *Gyropsylla spegazziniana* (Lizer, 1917) (Hemiptera: Psyllidae), *Thelosia camina* Schaus, 1920 (Lepidoptera: Eupterotidae), *Hylesia* (Hübner, 1820) (Lepidoptera: Saturniidae), *Ceroplastes grandis* Hempel, 1900 (Hemiptera: Coccidae), *Oligonychus yorthesi* (Mc Gregor, 1914) e *Isomerida picticollis* Bates, 1881 (Coleoptera: Cerambycidae) (Iede et al. 2000). De todos os problemas de cunho fitossanitário que ocasionam significativas perdas econômicas para a erva-mate, *H. betulinus* é sem dúvida o mais importante.

H. betulinus é conhecido também como broca-da-erva-mate ou corintiano e causa severos danos as erva-mates. Adultos medem aproximadamente 25 mm de comprimento, seu corpo apresenta coloração em geral preta, sendo recoberto em quase toda a sua superfície por pêlos brancos, e possuem antenas longas e finas (Iede 1985) (Figura 1).



Figura 1. Inseto adulto de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) em erva mate, *Ilex paraguariensis* (St Hilaire, 1929). Fonte: (Fotos: Marcy Fonseca).

Segundo Guedes et al. (2000), o período de maior intensidade de alimentação para ambos os sexos ocorre entre 10 e 18 h, sendo as fêmeas mais vorazes que os machos.

Também foi detectada a preferência do inseto em ocupar a extremidade dos ramos, comportamento possivelmente associado aos vôos de dispersão. Os adultos copulam praticamente em todas as horas do dia e em todo o galho, não demonstrando preferência por local específico, e o maior número de cópulas ocorre no período da tarde e início da noite (Guedes et al. 2000). Os adultos ocorrem no campo a partir de setembro, com pico populacional no mês de dezembro, tendendo a desaparecer em março (Penteado 1995).

As fêmeas realizam as posturas principalmente no colo da planta ou nas fendas da casca do tronco. Também pode fazê-las nas raízes expostas e regiões dos galhos onde ocorreu a última poda (Cassanello 1993, Penteado 1995).

As larvas são ápodas e brancas e são elas que causam severos danos na cultura da erva-mate. Ao se alimentar, elas constroem galerias subcorticais nos troncos e ramos da planta (Figura 2A). Durante o broqueamento a larva produz uma grande quantidade de serragem que garante sua proteção (Figura 2B) e muitas vezes atingem as raízes, impedindo a circulação da seiva na planta (Figura 2C) (Cassanello 1993).

A larva de *H. betulinus* apresenta de oito a dez ínstaes e o desenvolvimento larval dura, em média, 278,36 dias. O período de pré-pupa dura cerca de 7,23 dias e inicia-se no momento em que a larva, após construir a câmara pupal, fica em posição de repouso com o corpo retraído e curvado. O ciclo de vida é de aproximadamente 423 dias para machos e 490 dias para fêmeas em condições de laboratório (Cassanello 1993).



Figura 2. Danos causados pelas larvas de *H. betulinus*: A – galerias longitudinais causadas durante a alimentação; B – broqueamento de todo ramo e C – broqueamento da raiz da erva. Fonte: (Fotos: Marcy Fonseca).

Os sintomas de ataque da larva encontrados em campo são: presença de serragem próxima ao colo das erva (Figura 3A) e plantas enfraquecidas com folhagem escassa e amareladas. Em plantios onde o ataque é intenso, é possível observar um grande número de galhos quebrados devido ao enfraquecimento pelas galerias e pela ação do vento (Figura 3B) (Cassanello 1993, Iede et al. 2000).



Figura 3. Sintomas do ataque da larva encontrados em campo: A – presença de serragem no colo da planta e B – galhos quebrados. Fonte: (Fotos: Marcy Fonseca).

Atualmente, o método de controle mais utilizado para *H. betulinus* é o controle mecânico, através da catação dos adultos. Apesar de primitivo, este método é adotado pela maioria dos produtores em função da sua eficiência e fácil execução. No entanto, esse método requer muita disponibilidade de mão-de-obra e deve ser realizado sistematicamente durante os meses de ocorrência do inseto em campo. Quando a catação não é realizada, pode apresentar um aumento populacional de 3,2 vezes ao ano com graves prejuízos à cultura (Soares & Iede 1997).

O emprego de inseticidas para erva-mate é proibido pela legislação, e também não há princípios ativos eficazes e de baixa toxicidade comprovados para esta cultura (Soares & Iede 1997). O uso de inseticidas seria difícil em função das características comportamentais do inseto. Como citado anteriormente, as larvas ficam protegidas dentro dos ramos e troncos das plantas até sua emergência, tornando quase impossível atingí-las, o que torna o controle químico um método pouco eficiente. Aliado a isso, o fato do produto ser consumido “in natura” reforça a necessidade de métodos de controle inseridos no Manejo Integrado de Pragas (MIP), visando um produto final sem resíduos tóxicos.

Um dos possíveis métodos para o controle de *H. betulinus* é o biológico. Borges (2007) demonstrou o potencial do controle biológico de *H. betulinus* com o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em monocultivo de erva-mate. Segundo essa autora, duas aplicações anuais de *B. bassiana* no tronco da erva-mate são eficazes para o controle de *H. betulinus*. Devido aos bons resultados, o produto já teve seu registro aprovado e está sendo comercializado.

Outro método de controle que pode ser utilizado no manejo integrado de *H. betulinus* é a utilização de semioquímicos, principalmente os feromônios sexuais, que funcionam como atraentes específicos em armadilhas para a detecção e captura de insetos.

OBJETIVO

O objetivo dessa tese foi isolar, identificar e avaliar a atividade biológica do feromônio sexual produzido pelos machos de *H. betulinus*, assim como, determinar a região do corpo onde se localizam as glândulas responsáveis pela sua produção.

O trabalho foi dividido em 3 capítulos. O primeiro capítulo descreve o comportamento de acasalamento e a evidência de feromônios específicos do macho e da fêmea de *H. betulinus*. No capítulo II foi estabelecida a estrutura química dos compostos macho-específicos e avaliada a atividade biológica dos compostos isoladamente ou na presença de voláteis da planta hospedeira. Determinou-se também a dinâmica de produção dos compostos feromonais e a quantificação desses compostos na presença e ausência da planta hospedeira. Finalmente, no capítulo III determinou-se a localização das glândulas de feromônio sexual do macho de *H. betulinus* e alguns aspectos relacionados à biossíntese dos compostos identificados.

REVISÃO DE LITERATURA

Feromônios de Cerambycidae

A família Cerambycidae se destaca pelo grande número de espécies e pelo alto grau de polifagia, atacando principalmente plantas cultivadas como frutíferas e essências florestais, além de plantas silvestres (Canettieri & Garcia 2000). Existe uma estimativa de 35.000 espécies de Cerambycidae em todo o mundo (Lawrence 1982), pertencentes às seguintes subfamílias: Parandrinae, Prioninae, Oxypeltinae, Anoplodermatinae, Aseminae, Spondylinae, Lepturinae, Cerambycinae e Lamiinae (Napp 1994). A maioria dos adultos ultrapassa 2 cm de comprimento, apresentam corpo alongado e cilíndrico e antenas longas (Linsley 1959). As fêmeas depositam seus ovos em fendas de cascas de árvores e as larvas penetram no cerne, sendo vulgarmente conhecidas como brocas. A maioria dos cerambicídeos é xilófaga, causando grandes danos econômicos a diversas culturas (Linsley 1959, Hanks 1999).

A necessidade de técnicas de controle mais eficientes, que otimizem o custo de produção sendo menos nocivas ao ambiente, tem aumentado a investigação do uso de semioquímicos, principalmente os feromônios, para o manejo de pragas de difícil detecção e controle (Borges & Aldrich 2001). Durante a última década houve avanços expressivos na pesquisa para a identificação de feromônios para muitas espécies de cerambicídeos em todo o mundo, objetivando principalmente o desenvolvimento de novas técnicas de controle. O número de espécies com feromônio identificados na família Cerambycidae estão listados nas Tabelas 1, 2 e 3.

A maioria dos feromônios identificados em cerambicídeos pertencem a espécies da subfamília Cerambycinae. Machos de várias espécies dessa subfamília produzem feromônio sexual e de agregação. Os componentes do feromônio sexual e de agregação

geralmente apresentam estruturas similares e contém moléculas de cadeia curta (6 a 10 carbonos) com grupos α -hidróxi cetonas e/ou (α,β -dióis) (Hanks et al. 2007, Lacey et al. 2008a). Entretanto, há exceções, como em *Hylotrupes bajulus* (Linné), que apresenta o 1-butanol dentre os componentes do feromônio sexual (Fettköther et al. 1995); em *Phymatodes lecontei* Linsley cujo feromônio de agregação foi identificado como (*R*)-2-metilbutan-1-ol (Hanks et al. 2007); *Megacyllene caryae* (Gahan) com o feromônio de agregação apresentando terpenóides e alcoóis aromáticos (Lacey et al. 2008a); e também o feromônio de agregação de *Rosalia funebris* Motschulsky, que foi identificado como o (*E*)-2-hexenoato de (*Z*)-3-decenila (Ray et al. 2009). Na subfamília Lamiinae foi identificado somente o feromônio de agregação produzido pelos machos de *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky) (Zhang et al. 2002).

As estruturas dos componentes produzidos pelos machos da subfamília Cerambycinae são diferentes dos feromônios já identificados para fêmeas das espécies *Migdolus fryanus* Westwood (amida), *Prionus californicus* Motschulsky (ácido carboxílico) e *Vesperus xatari* Dufour (monoterpenóide oxigenado), as quais pertencem às subfamílias Anoplodermatinae, Prioninae e Vesperinae, respectivamente (Leal et al. 1994, Rodstein et al. 2009, Boyer et al. 1997).

Alguns componentes feromonais são atrativos somente quando combinados com voláteis da planta hospedeira, como é o caso dos besouros *Tetropium fuscum* (F.) e *T. cinnamopterum* Kirby, da subfamília Spondylidinae, que produzem o componente (*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ol. Esse componente foi atrativo para os besouros somente quando combinados com a mistura de etanol e monoterpenos do hospedeiro (Silk et al. 2007).

Em algumas espécies de cerambicídeos, as fêmeas produzem feromônios de contato e geralmente envolvem hidrocarbonetos cuticulares. Os hidrocarbonetos estão

presentes na camada de cera na cutícula dos insetos, onde há também ácidos graxos, ésteres, álcoois, aldeídos e cetonas que protegem o inseto da dessecação (Gibbs 1998). Os feromônios de contato mediam o reconhecimento de parceiros, sendo responsáveis pelo comportamento pré-copulatório (Kim et al. 1993, Fukaya et al. 1996, Fukaya et al. 1997, Fukaya et al. 2000, Wang 1998, Ginzl & Hanks, 2003, Ginzl et al. 2003a).

Foram identificados feromônios de contato nas seguintes espécies da subfamília Cerambycinae: *M. robiniae* (Forster) (Ginzl et al. 2003a), *M. caryae* (Ginzl et al. 2006) e *Xylotrechus colonus* (F.) (Ginzl et al. 2003b), *Neoclytus acuminatus acuminatus* (Lacey et al. 2008b) e três espécies da subfamília Lamiinae, *A. glabripennis* (Zhang et al. 2003), *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Fukaya et al. 2000) e *Psacothoea hilaris* (Pascoe) (Fukaya et al. 1996). Em todos os casos, os componentes feromoniais de contato são constituídos de hidrocarbonetos cuticulares de cadeia longa ou hidrocarbonetos com ramificações metil, exceto em *A. malasiaca* onde o feromônio é constituído também de grupo cetona (Yasui et al. 2003, Yasui et al. 2007).

Não há estudos da ecologia química da broca-da-erva-mate, *H. betulinus* (Lamiinae), que é o objetivo de estudo da presente pesquisa.

Tabela 1. Relação das espécies de Cerambycidae com feromônio sexual identificados

Espécie/Subfamília	Feromônio Sexual	Referência
<i>M. fryanus</i> /Anoplodermatidae	N-(2'S)- metilbutanoil-(2S)-metilbutilamina; N-formil L-isoleucina metil éster	Leal et al. 1994
<i>Anaglyptus subfasciatus</i> Pic/Cerambycinae	(R)-3-hidróxihexan-2-ona; (R)-3-hidróxiocetan-2-ona; 2-metil fenilacetato (componente floral)	Leal et al. 1995, Nakamuta et al. 1997
<i>H. bajulus</i> /Cerambycinae	(R)-3-hidróxihexan-2-ona; 2-hidróxihexan-3-ona; (2R, 3R)-2,3-hexanodiol; (2S, 3R)-2,3-hexanodiol; hexan-2,3-diona; 1-butanol	Schröder et al. 1994, Fettköther et al. 1995
<i>Xylotrechus pyrrhoderus</i> Bates/Cerambycinae	(2S, 3S)-octanodiol; (2S)-hidróxi-3-octanona	Sakai et al. 1984
<i>Xylotrechus chinensis</i> (Chevrolat)/Cerambycinae	2,3-octanodiol; 2-hidróxi-3-octanona; 3-hidróxi-2-octanona	Iwabuchi et al. 1987, Kuwahara et al. 1987
<i>Xylotrechus quadripes</i> Chevrolat/Cerambycinae	(S)-2-hidróxi-3-decanona; 3-hidróxi-2-decanona; (S, S)-2,3-dihidróxiocetano	Hall et al. 1998, Hall et al. 2006
<i>P. californicus</i> /Prioninae	Ácido (3,5)-dimetil-pentadecanóico	Rodstein et al. 2009
<i>V. xatari</i> /Vesperinae	10-oxoisopiperitenona (vesperal); 10-hidróxiisopiperitenona (vesperol)	Boyer et al. 1997
<i>T. fuscum</i> e <i>T. cinnamopterum</i> / Spondylidinae	(E)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ol	Silk et al. 2007

Tabela 2. Relação das espécies de Cerambycidae com feromônio de agregação identificado

Espécie/Subfamília	Feromônio de Agregação	Referência
<i>Xylotrechus nauticus</i> (Mannerheim)/Cerambycinae	(<i>R</i>)- 3-hidróxihexan-2-ona; (<i>S</i>)-3-hidróxihexan-2-ona	Hanks et al. 2007
<i>Neoclytus acuminatus acuminatus</i> /Cerambycinae	(2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)-hexanodiol	Lacey et al. 2004
<i>Neoclytus modestus modestus</i> (Fabricius)/Cerambycinae	(3 <i>R</i>)-3-hidróxihexan-2-ona	Hanks et al. 2007
<i>Neoclytus mucronatus mucronatus</i> (Fabricius)/Cerambycinae	(3 <i>R</i>)-3-hidróxihexan-2-ona	Lacey et al. 2007
<i>P. lecontei</i> /Cerambycinae	(<i>R</i>)-2-metilbutan-1-ol	Hanks et al. 2007
<i>M. caryae</i> /Cerambycinae	(2 <i>S</i> , 3 <i>R</i>)-2,3-hexanodiol; (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2,3-hexanodiol; (<i>S</i>)-(-)-limoneno; 2-feniletanol; (-)- α -terpineol; nerol; neral; geranial	Lacey et al. 2008a
<i>R. funebris</i> /Cerambycinae	(<i>E</i>)-2-hexenoato de (<i>Z</i>)-3-decenila	Ray et al. 2009

Tabela 3. Relação das espécies de Cerambycidae com feromônio de contato identificado

Espécie/Subfamília	Feromônio de Contato	Referência
<i>M. robiniae</i> /Cerambycinae	(Z)-9-pentacoseno	Ginzel et al. 2003a
<i>M. caryae</i> /Cerambycinae	(Z)-9-nonacoseno	Ginzel et al. 2006
<i>X. colonus</i> /Cerambycinae	<i>n</i> -pentacosano; 9-metilpentacosano; 3-metilpentacosano	Ginzel et al. 2003b
<i>Neoclytus acuminatus acuminatus</i> /Cerambycinae	7-metilheptacosano; 7-metilpentacosano; 9-metilheptacosano	Lacey et al. 2008b
<i>A. glabripennis</i> /Lamiinae	(Z)-9-tricoseno; (Z)-9-pentacoseno; (Z)-7-pentacoseno; (Z)-9-heptacoseno; (Z)-7-heptacoseno	Zhang et al. 2003
<i>A. malasiaca</i> /Lamiinae	Heptacosano; nonacosano; 4-metilhexacosano; 4-metiloctacosano; 9-metilheptacosano; 9-metilnonacosano; 15-metilhentriacontano; 15-metiltritriacontano; heptacosan-10-ona; (Z)-18-heptacosen-10-ona; (Z,Z)- 18,21-heptacosadien-10-ona; (Z,Z,Z)- 18, 21, 24-heptacosatrien-10-ona; heptacosan-12-ona;	Fukaya et al. 2000, Yasui et al. 2003, Yasui et al. 2007
<i>P. hilaris</i> /Lamiinae	(Z)-21-metil-pentatriaconteno	Fukaya et al. 1996

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borges, L. R. 2007. Eficiência de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycota) para o controle de *Hedypathes betulinus* (Klug) (Coleoptera: Cerambycidae) em erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. 102 p.
- Borges, M. & Aldrich, J. R. 2001. Feromônio de Heteroptera: Oportunidades para o manejo de insetos benéficos, PP. 93-98. In: Vilela, E. F & Della Lúcia, T. M. C. (eds) Feromônios de Insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas (2nd. Ed.). Holos Editora, Ribeirão Preto-SP.
- Boyer, F. D., Malosse, C., Zagatti, P. & Einhorn, J. 1997. Identification and synthesis of vesperal, the female sex pheromone of the longhorn beetle *Vesperus xatari*. Bull. Soc. Chim. Fr. 134: 757 - 764.
- Canettieri, E. R. P. S. & Garcia, A. H. 2000. Abundância relativa das espécies de Cerambycidae (Insecta – Coleoptera) em pomares de frutíferas misto. Pesq. Agrop. Trop. 30: 43 – 50.
- Cassanello, A. M. L. 1993. Ciclo de vida e aspectos morfológicos de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera, Cerambycidae, Lamiinae), a broca-da-erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. 61p.

Embrapa 2005. Erva-mate. <http://www.sistemadeproducao.cnptia.embrapa.br/>

Fettköther, R., Dettner, K., Schröder, F., Meyer, H., Francke, W. & Nold, U. 1995. The male pheromone of the old house borer *Hylotrupes bajulus* (L.) (Coleoptera: Cerambycidae): Identification and response. *Experientia* 51: 270 – 277.

Fukaya, M., Akino, T., Yasuda, T., Wakamura, S., Satoda, S. & Senda, S. 2000. Hydrocarbon components in contact sex pheromone of the White-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae) and pheromonal activity of synthetic hydrocarbons. *Entomol. Science* 3: 211 – 218.

Fukaya, M., Wakamura, S., Yasuda, T., Senda, S., Omata, T. & Fukusaki, E. 1997. Sex pheromonal activity of geometric and optical isomers of synthetic contact pheromone to males of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 32: 654 – 656.

Fukaya, M., Yasuda, T., Wakamura, S. & Honda, H. 1996. Reproductive biology of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae). III. Identification of contact sex pheromone on female body surface. *J.Chem. Ecol.* 22: 259 – 270.

Gibbs, A. G. 1998. Water-proofing properties of cuticular lipids. *Am. Zool.* 38: 471 – 482.

- Ginzel, M. D. & Hanks, L. M. 2003. Contact pheromones as mate recognition cues of four species of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *J. Insect. Behav.* 16: 181 – 187.
- Ginzel, M. D., Millar, J. G. & Hanks, L. M. 2003a. (Z)-9-Pentacosene – contact sex pheromone of the locust borer, *Megacyllene robiniae*. *Chemoecology* 13: 135 – 141.
- Ginzel, M. D., Blomquist, G. J., Millar, J. G. & Hanks, L. M. 2003b. Role of contact pheromones in mate recognition in *Xylotrechus colonus*. *J. Chem. Ecol.* 29: 533 – 545.
- Ginzel, M. D., Moreira, J. A., Ray, A. M., Millar, J. G. & Hanks, L. M. 2006. (Z)-9-nonacosene – major component of the contact sex pheromone of the beetle *Megacyllene caryae*. *J. Chem. Ecol.* 32: 435 – 451.
- Guedes, J. V. C., d'Ávila, M. & Dornelles, S. H. B. 2000. Comportamento de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) em erva-mate em campo. *Ciência Rural, Santa Maria* 30: 1059 – 1061.
- Hall, D. R., Cork, A., Phythian, S. J., Chittamuru, S., Jayarama, B. K., Venkatesha, M. G., Sreedharan, K., Vinod Kumar, P. K., Seetharama, H. G. & Naidu, R. 2006. Identification of components of male-produced pheromone of coffee white stemborer, *Xylotrechus quadripes*. *J. Chem. Ecol.* 32: 195 – 219.

- Hall, D. R., Cork, A., Phythian, S., Sumathi, C., Jayarama, B. K., Venkatesha, M. G., D'Souza, V. M. & Naidu, R. 1998. Studies on the male sex pheromone of the coffee white stem borer, *Xylotrechus quadripes* Chevrolat (Coleoptera: Cerambycidae). 2nd International Symposium on Insect Pheromones, Wageningen, The Netherlands. pp.50 – 52.
- Hanks, L. M. 1999. Influence of the larval host plant on reproductive strategies of cerambycid beetles. *Am. Rev. Entomol.* 44: 483 – 505.
- Hanks, L. M., Millar, J. G., Moreira, J. A., Barbour, J. D., Lacey, E. S., McElfresh, J. S., Reuter, F. R. & Ray, A. M. 2007. Using generic pheromone lures to expedite identification of aggregation pheromones for the cerambycid beetles *Xylotrechus nauticus*, *Phymatodes lecontei*, and *Neoclytus modestus modestus*. *J. Chem. Ecol.* 33: 889 – 907.
- IBGE 2008. Extração vegetal. [Http://www.sidra.ibge.gov.br/](http://www.sidra.ibge.gov.br/)
- Iede, E. T. & Machado, D. C. 1989. Pragas da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) e seu controle. Embrapa/CNPq. Colombo. Bol. Pesq. Flor. 18/19, PP. 51-60.
- Iede, E. T. 1985. Considerações sobre a entomofauna da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais – Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Embrapa/CNPq. 146p.

- Iede, E. T., Soares, C. M. S., Grigoletti, Jr. A. & Auer, C. G. 2000. Manual de identificação de pragas e doenças da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Embrapa/CNPQ. Colombo. 24p.
- Iwabuchi, K., Takahashi, J. & Sakai, T. 1987. Occurrence of 2,3-octanediol and 2-hydroxy-3-octanone, possible male sex pheromone in *Xylotrechus chinensis* Chevrolat (Coleoptera: Cerambycidae). Appl. Entomol. Zool. 22: 110 – 111.
- Kim, G. H., Takabayashi, J., Takahashi, S. & Tabata, K. 1993. Function of contact pheromone in the mating behavior of the cryptomeria bark borer, *Semanotus japonicus* Lacordaire (Coleoptera: Cerambycidae). Appl. Entomol. Zool. 28: 525 – 535.
- Kuwahara, Y., Matsuyama, S. & Suzuki, T. 1987. Identification of 2,3-octanediol, 2-hydroxy-3-octanone and 3-hydroxy-2-octanone from male *Xylotrechus chinensis* Chevrolat as possible sex pheromones (Coleoptera: Cerambycidae). Appl. Entomol. Zool. 22: 25 – 28.
- Lacey, E. S., Moreira, J. A., Millar, J. G. & Hanks, L. M. 2008a. A male-produced aggregation pheromone blend consisting of alkanediols, terpenoids, and an aromatic alcohol from the cerambycid beetle *Megacyllene caryae*. J. Chem. Ecol. 34: 408 – 417.

- Lacey, E. S., Ginzl, M. D., Millar, J. G. & Hanks, L. M. 2008b. 7-methylheptacosane is a major component of the contact sex pheromone of the cerambycid beetle *Neoclytus acuminatus acuminatus*. *Physiol. Entomol.* 33: 209 – 216.
- Lacey, E. S., Moreira, J. A., Millar, J. G., Ray, A. M. & Hanks, L. M. 2007. Male-produced aggregation pheromone of the longhorned beetle *Neoclytus mucronatus mucronatus*. *Entomol. Exp. Appl.* 122: 171 – 179.
- Lacey, E. S., Ginzl, M. D., Millar, J. G. & Hanks, L. M. 2004. Male-produced aggregation pheromone of the cerambycid beetle *Neoclytus acuminatus acuminatus*. *J. Chem. Ecol.* 30:1493 – 1507.
- Lawrence, J. F. 1982. Coleoptera. In Parker SP (ed.) *Synopsis and Classification of Living Organisms, USA, NY-New York: McGraw Hill.* 2: 482 – 553.
- Leal, W. S., Shi, X., Nakamura, K., Ono, M. & Meinwald, J. 1995. Structure, stereochemistry, and thermal isomerization of the male sex pheromone of the longhorn beetle *Anaglyptus subfasciatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 1038 – 1042.
- Leal, W. S., Bento, J. M. S., Vilela, E. F. & Della Lucia, T. M. C. 1994. Female sex pheromone of the longhorn beetle *Migdolus fryanus* Westwood: N- (2'S)-methylbutanoyl 2-methylbutylamine. *Experientia* 50: 853 – 856.
- Linsley, E. G. 1959. Ecology of Cerambycidae. *Ann. Rev. Entomol.* 4: 99 – 138.

- Nakamuta, K., Leal, W. S., Nakashima, T., Tokoro, M., Ono, M. & Nakanishi. 1997. Increase of trap catches by a combination of male sex pheromones and floral attractant in the longhorn beetle, *Anaglyptus subfasciatus*. J. Chem. Ecol. 23: 1635 – 1640.
- Napp, D. S. 1994. Phylogenetic relationships among the subfamilies of Cerambycidae (Coleoptera, Chrysomeloidea). Rev. Bras. Entomol. 38: 265 – 419.
- Oliveira, Y. M. M. & Rotta. E. 2005. Cultivo da Erva-Mate. Embrapa Floresta. Disponível em: <http://sistemasdeprodução.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ervamate/cultivodaervamate>. Acesso em 03/01/2010.
- Penteado, S. R. C. 1995. Principais pragas da erva-mate e medidas alternativas para seu controle. In: Winge. H., Ferreira, A. G., Mariath, J. E.A., Tarasconi, L. C. (Ed.), Erva-mate: Biologia e Cultura no Cone Sul. Porto Alegre, Ed. Universidade, 109-120 p.
- Ray, A. M., Millar, J. G., McElfresh, J. S., Swift, I. P., Barbour, J. D. & Hanks, L. M. 2009. Male-produced aggregation pheromone of the cerambycid beetle *Rosalia funebris*. J. Chem. Ecol. 35: 96 – 103.
- Rodstein, J., McElfresh, S., Barbour, J. D., Ray, A. M., Hanks, L. M. & Millar, J. G. 2009. Identification and synthesis of a female-produced sex pheromone for the cerambycid beetle *Prionus californicus*. J. Chem. Ecol. 35: 590 – 600.

- Sakai, T., Nakagawa, Y., Takahashi, J., Iwabuchi, K. & Ishii, K. 1984. Isolation and identification of the male sex pheromones of the grape borer *Xylotrechus pyrrhoderus* Bates (Coleoptera: Cerambycidae). Chem. Letters. 263 – 264.
- Schröder, F., Fettköther, R., Noldt, U., Dettner, K., König, W. A. and Franke, W. 1994. Synthesis of (3*R*)-3-hydroxy-2-hexanone, (2*R*, 3*R*)-2,3-hexanediol and (2*S*, 3*R*)-2,3-hexanediol, the male sex pheromone of *Hylotrupes bajulus* and *Pyrrhidium sanguineum* (Cerambycidae). Liebigs Ann. Chem. 12: 1211 – 1218.
- Silk, P. J., Sweeney, J., Wu, J., Price, J., Gutowski, L. M. & Kettela, E. G. 2007. Evidence for a male-produced pheromone in *Tetropium fuscum* (F.) and *Tetropium cinnamopterum* (Kirby) (Coleoptera: Cerambycidae). Naturwissenschaften 94: 697 – 701.
- Soares, C. M. S. & Iede, E. T. 1997. Perspectivas para o controle da broca-da-erva-mate *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) Coleoptera: Cerambycidae. In: I Congresso Sul-Americano da Erva-Mate e II Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da Erva-Mate. Curitiba, Ed. dos Organizadores, p. 391-400.
- Wang, Q. 1998. Evidence for a contact female sex pheromone in *Anoplophora chinensis* (Förster) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae). Coleopt. Bull. 52:363 – 368.

- Yasui, H., Akino, T., Yasuda, T., Fukaya, M., Ono, H. & Wakamura, S. 2003. Ketone components in the contact sex pheromone of the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca*, and pheromonal activity of synthetic ketones. Entomol. Exp. Appl. 107: 167 – 176.
- Yasui, H., Akino, T., Yasuda, T., Fukaya, M., Wakamura, S. & Ono, H. 2007. Gomadalactones A, B, and C: novel 3-oxabicyclo [3.3.0]octane compounds in the contact sex pheromone of the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca*. Tet. Lett. 48: 2395 – 2400.
- Zhang, A. J., Oliver, J. E., Chauhan, K., Zhao, B. G., Xia, L. Q. & Xu, Z. C. 2003. Evidence for contact sex recognition pheromone of the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Coleoptera: Cerambycidae). Naturwissenschaften 90: 410 – 413.
- Zhang, A., Oliver, J. E., Aldrich, J. R., Wang, B. & Mastro, V. C. 2002. Stimulatory beetle volatiles for the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Motschulaky). Z. Naturforsch. 57C: 553 – 558.

Capítulo I

Comportamento de acasalamento e evidência de feromônios sexo específicos de

***Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae)**

Comportamento de acasalamento e evidência de feromônios sexo específicos de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae)

RESUMO

O comportamento de acasalamento e a presença de feromônio produzido por machos e por fêmeas de *Hedypathes beutulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae) foi estudada no laboratório. A sequência de acasalamento dos adultos de *H. betulinus* inclui o direcionamento da fêmea para o macho, o contato antenal, a monta da fêmea pelo macho e a cópula. Essa seqüência do comportamento de acasalamento suporta a hipótese que o reconhecimento dos machos pelas fêmeas pode ser mediado por um feromônio macho-específico, e que os machos reconhecem as fêmeas por um feromônio de contato. As respostas comportamentais de machos e fêmeas de *H. betulinus* a voláteis de machos e fêmeas co-específicos no olfatômetro confirmaram a presença de um feromônio sexual produzido pelo macho. O resultado sugere que pistas visuais não são essenciais para elicitar respostas sexuais nas fêmeas. Três compostos macho-específicos foram detectados por meio de análises cromatográficas, provendo um suporte químico para os dados comportamentais. Machos não responderam às fêmeas mortas lavadas, mas 70% deles tentaram acasalar com fêmeas mortas lavadas e tratadas com extrato, sugerindo que os extratos continham feromônio de contato. Baseado nestes resultados constata-se que o feromônio sexual produzido pelo macho e o feromônio de contato produzido pela fêmea são essenciais no sistema de comunicação de *H. betulinus*.

Palavras-chave: Cerambycidae, comportamento de acasalamento, feromônios, olfatômetro-Y

Mating behaviour and evidence for sex-specific pheromones in *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae)

ABSTRACT

The mating behaviour and evidence for sex-specific pheromones of *Hedypathes beutulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae) were studied in the laboratory. The mating sequence of *H. betulinus* includes: female approaching the male, antennal contact, male mounting the female and start of copulation. This mating sequence provided support for our hypothesis that recognition of males by females may be mediated by a male-produced pheromone and males recognize females by contact pheromones. The behavioural responses in an olfactometer of male and female *H. betulinus* to volatiles released by male and female conspecifics confirmed the presence of a male-produced sex pheromone. This finding suggests that visual cues are not primary in eliciting a sexual response from females. Three male-specific compounds were detected in the chromatographic analysis, providing chemical support to the behavioural data. Males did not respond to dead-washed females but 70% of males attempted to mate with dead-washed extract-treated females, suggesting that extracts contained contact pheromones. Based on these results, a male-produced sex pheromone and a female-produced contact pheromone should be essential in the communication system of *H. betulinus*.

Keywords: Cerambycidae, mating behaviour, pheromones, Y-olfactometer

1. INTRODUÇÃO

Os besouros da família Cerambycidae estão entre os mais importantes insetos pragas no mundo, degradando madeira, danificando e matando árvores em florestas, pomares, plantações e paisagens urbanas. A falta de informações sobre o comportamento dos adultos, particularmente a função dos semioquímicos na reprodução, dificulta o desenvolvimento de estratégias de manejo e a detecção eficaz para várias espécies de importância econômica (Solomon 1995).

Para a maioria das espécies de cerambicídeos tem sido considerada que a localização de parceiros depende de machos encontrarem as fêmeas por acaso, e que o seu reconhecimento ocorre pelo contato antenal ou em resposta a um feromônio que opera a curta distância (Hanks 1999). Em algumas espécies existe a evidência que o feromônio opera a curta e/ou a longa distância para localização de parceiros (Schlyter & Birgersson 1999, Alisson et al. 2004).

Hedypathes betulinus (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae) é a principal praga da erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hilaire (Aquifoliaceae). A cultura da erva-mate é a base econômica de muitos municípios da região do sul do Brasil, e um dos maiores problemas encontrados pelos produtores é o controle dessa praga (Guedes et al. 2000).

Os adultos medem aproximadamente 25 mm de comprimento, apresentam coloração branca com desenhos escuros no protórax e nos élitros. As antenas são longas e finas e apresentam manchas brancas e escuras alternadas (Iede 1985). As larvas constroem galerias no sentido longitudinal dos troncos e galhos da planta, impedindo a circulação normal da seiva, resultando no depauperamento das ervaíras. Ao perfurar o tronco, a larva deixa atrás de si uma serragem que vai se acumulando na base do caule, denunciando a presença da broca, que chega a destruir até 60% dos ervaíras (Brandão

Filho 1945, Mazuchowski 1991, Cassanello 1993). A coleta manual dos adultos e a destruição de galhos e troncos infestados são as medidas mais utilizadas para evitar infestações da praga.

O conhecimento do comportamento de acasalamento de *H. betulinus* pode fornecer informações para o desenvolvimento de medidas de controle mais eficazes. Diante disso, o objetivo deste capítulo foi investigar a sequência do comportamento de acasalamento de *H. betulinus* e evidenciar a presença de feromônios específicos de machos e fêmeas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Insetos

Os adultos de *H. betulinus* usados para o desenvolvimento desta pesquisa foram coletados em plantações de erva-mate na empresa Vier localizada no Município de São Mateus do Sul, Paraná. Os insetos foram transportados para o Laboratório de Semioquímicos do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná. Os indivíduos foram sexados de acordo com a metodologia de Cassanello (1993), que descreveu que o escape da antena e o fêmur são de diâmetro maior nos machos. Machos e fêmeas foram colocados individualmente em potes plásticos (8,5 cm altura x 7,5 cm diâmetro) e alimentados semanalmente com pedaços de ramos de erva-mate (Figura 1) sendo mantidos a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $60 \pm 5\%$ e fotoperíodo de 12L:12E. Como os insetos foram coletados no campo, a idade e a condição reprodutiva dos adultos não eram conhecidas.



Figura 1. Potes plásticos (8,5 cm altura x 7,5 cm diâmetro) utilizados para manutenção dos adultos de *H. betulinus* no laboratório.

2.2. Comportamento de acasalamento

Para descrever a sequência do comportamento de acasalamento e identificar pistas usadas na localização entre parceiros, adultos de *H. betulinus* foram observados no laboratório durante a fotofase, no período entre 14 e 18h. As observações foram realizadas no mesmo período em que Guedes et al. (2000) observaram o maior número de acasalamento de *H. betulinus* em campo. Em uma arena plástica (38 cm comprimento x 27 cm altura) foram colocados macho e fêmea numa distância de 30 cm um do outro (Figura 2). Foi utilizada uma câmera digital (HP Photosmart M627; Hewlett-Packard, Miami, USA) para registrar a aproximação dos indivíduos e a cópula. Foram observados oito casais e após cada casal ser testado, a arena era limpa com álcool para remover qualquer pista química.



Figura 2. Arena plástica (38 cm comprimento x 27 cm altura) utilizada para a avaliação do comportamento de acasalamento de *H. betulinus*.

2.3. Coleta de Voláteis

A coleta dos voláteis foi feita por meio do processo de aeração (Zarbin et al. 1999, Zarbin 2001). Nesse método foram utilizadas câmaras de vidro (33 cm comprimento x 3,5 cm diâmetro) (Figura 3A), onde foram colocados grupos separados de 4 machos e 4 fêmeas de *H. betulinus*. Um fluxo contínuo de ar umidificado e filtrado atravessou as câmaras, carregando todos os voláteis liberados pelos insetos que ficaram retidos em colunas de vidro (11 cm comprimento x 1 cm diâmetro) contendo 0,8 g de polímero adsorvente (Super Q) (Figura 3B) (Zarbin et al. 2003). Após 24 h do início da aeração a dessorção dos compostos liberados pelos machos e pelas fêmeas foi feita utilizando hexano destilado (Figura 3C). Voláteis de machos e fêmeas foram coletados diariamente durante 15 dias e os insetos foram trocados semanalmente. Os extratos diários não foram combinados e foram concentrados para 400 μ L (um inseto para 100 μ L) utilizando gás argônio (Figura 3D). Em seguida os extratos foram armazenados em freezer até serem utilizados para as análises e bioensaios.

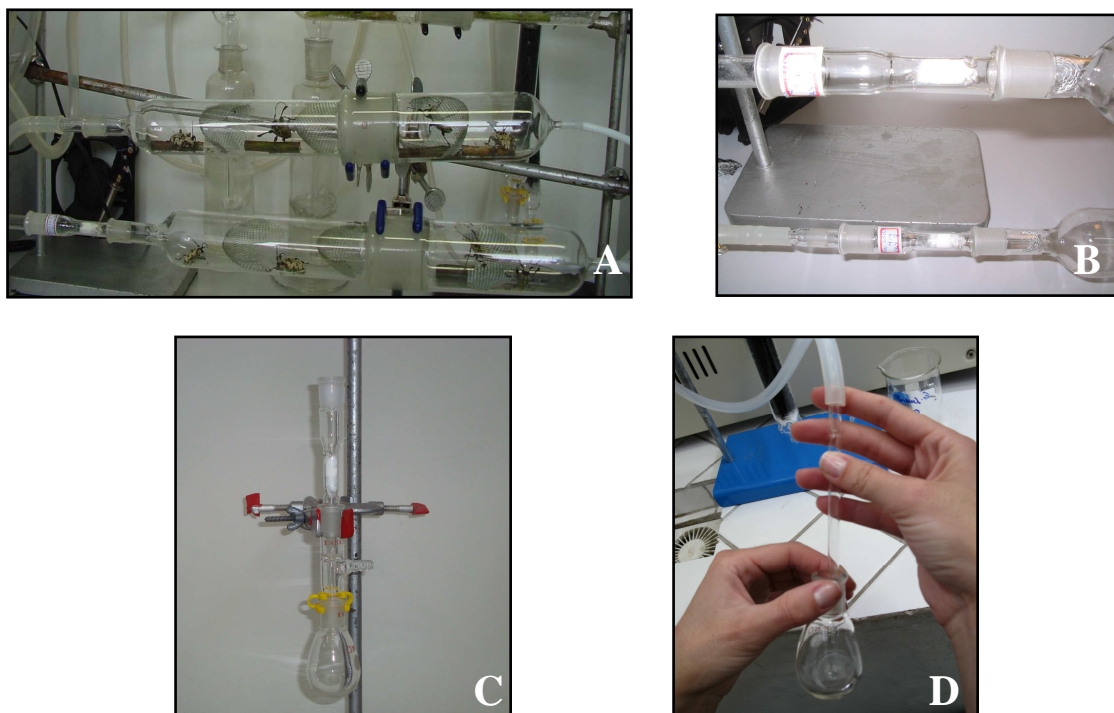


Figura 3. Coleta de voláteis de adultos de *H. betulinus*: A – Câmaras de vidro com machos ou fêmeas; B – Coluna de vidro contendo Super Q; C – Lavagem da coluna com hexano e D – Concentração dos extratos com gás argônio.

2.4. Bioensaios em olfatômetro

A resposta comportamental de adultos de *H. betulinus* para voláteis coletados de machos e fêmeas foi verificada usando o olfatômetro em Y, operado com um fluxo de ar contínuo de 4 L/min, previamente umidificado e filtrado com carvão ativado. O olfatômetro consiste de um tubo de vidro de 4 cm de diâmetro em forma de Y, com o tubo principal com 40 cm de comprimento e dois braços menores de 20 cm comprimento cada. Antes de iniciar os testes, foi feita uma simulação da propagação do odor para visualizar a distribuição da pluma dentro do sistema. Para isto, ácido clorídrico e hidróxido de amônio foram misturados, seguindo a metodologia descrita por Baker & Linn (1984).

A fonte de odor utilizada foi um pedaço de papel filtro (2 x 2 cm) impregnado com 20 µL (0,2 inseto equivalente) de extrato de fêmeas, extrato de machos ou hexano (controle) que foi colocado na base de cada braço do olfatômetro. Um macho ou fêmea foi introduzido na base do tubo principal do olfatômetro e seu comportamento foi observado durante 20 min. A resposta foi registrada quando o besouro caminhava contra o fluxo de ar e tocava o papel filtro que continha a fonte de odor (extrato de machos, extrato de fêmeas ou controle). E como não resposta quando o besouro não caminhava contra o fluxo de ar e/ou não tocava nenhuma das fontes de odor durante os 20 min. observados. Após observar 4 insetos, o olfatômetro era limpo com álcool e um fluxo de ar limpo era passado por 5 min, sendo a posição dos braços do olfatômetro invertida para evitar qualquer interferência externa.

Foram conduzidos quatro experimentos: (i) resposta de machos para extrato de machos versus controle; (ii) resposta de fêmeas para extrato de machos versus controle; (iii) resposta de machos para extrato de fêmeas versus controle; e (iv) resposta de fêmeas para extrato de fêmeas versus controle. Para cada experimento foram testados pelo menos 50 machos ou fêmeas e cada indivíduo testado foi considerado como uma repetição. A fonte de odor foi trocada a cada indivíduo testado. Os experimentos foram realizados durante a fotofase no período da tarde, quando os insetos estavam em maior atividade (Guedes et al. 2000). Cada inseto foi testado apenas uma vez.

Os dados da resposta de machos e fêmeas para os diferentes tratamentos em olfatômetro foram analisados utilizando-se o teste Qui-quadrado no programa BioEstat (Ayres et al. 2003). Os insetos que não escolheram nenhum dos braços foram excluídos da análise estatística.

2.5. Procedimentos Analíticos

Uma alíquota de 1 µL do extrato de machos e do extrato de fêmeas obtidos na aeração foi injetada em um cromatógrafo a gás Varian 3800, equipado com detector por ionização em chama (FID), controle de pressão eletrônico e operado no modo “splitless”, contendo uma coluna capilar DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25 µm) (J&W Scientific, Folsom, Califórnia). As condições de análise foram as seguintes: temperatura inicial de 50° C por 1 minuto com aumento de 7°C por minuto até uma temperatura final de 250°C, a qual foi mantida por 10 minutos.

Após o término das corridas, os cromatogramas obtidos de extrato de machos e fêmeas foram comparados para detectar compostos químicos específicos de cada sexo.

2.6. Bioensaio em arena para confirmar a presença do feromônio de contato

Este bioensaio foi realizado seguindo o procedimento descrito por Ginzl & Hanks (2003) e Ginzl et al. (2003). As fêmeas individuais foram mortas em freezer (-4°C por 30 min) e em seguida deixadas por 15 min em temperatura ambiente antes de iniciar o experimento. O primeiro tratamento foi feito para testar se os machos reconheceriam as fêmeas mortas e tentariam acasalar, demonstrando assim que as pistas da fêmea estavam intactas. Dessa forma, um macho vivo foi colocado em uma arena plástica (15 cm de diâmetro por 18 cm de altura) e oferecido a ele uma fêmea morta.

Posteriormente, essa mesma fêmea morta foi imersa em três alíquotas de 1 mL de hexano destilado e mantida durante 10 min. para remoção dos hidrocarbonetos cuticulares da fêmea. As três alíquotas foram combinadas e concentradas para 1 mL utilizando gás argônio. A fêmea morta lavada foi oferecida ao mesmo macho para verificar se o mesmo tentaria acasalar, demonstrando que pistas químicas foram removidas pelo solvente e o acasalamento não foi elicitado por mecanorrecepção somente. E por fim, um tratamento foi feito para demonstrar que o extrato continha o

feromônio de contato. Para isso, 1 mL do extrato da fêmea morta foi impregnado na mesma fêmea lavada e deixado por alguns minutos para a evaporação do solvente. Em seguida essa fêmea foi oferecida outra vez ao mesmo macho para avaliar se havia feromônio de contato na fêmea impregnada.

A resposta foi registrada quando o macho, após o contato antenal, montou a fêmea e tentou copular, e não resposta quando o macho não mostrou nenhum desses comportamentos ou continuou a caminhar após o primeiro contato com a fêmea. Cada fêmea morta foi oferecida a dois machos diferentes ($n = 20$). Resposta de machos para fêmeas mortas e fêmeas mortas lavadas e tratadas com extrato foi comparada com resposta para fêmeas mortas lavadas utilizando-se o teste Qui-quadrado no programa BioEstat (Ayres et al. 2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sequência do comportamento de acasalamento de *H. betulinus* inclui: aproximação da fêmea para o macho, contato antenal, monta e cópula. Os oito casais observados demonstraram a seguinte sequência de acasalamento: (i) Aproximação: a fêmea que estava a 30 cm do macho imóvel aproximou-se do mesmo e nunca o inverso (estágios 1 e 2, Figura 4), sugerindo que a fêmea respondeu a pistas visuais ou químicas emitidas pelo macho. Não foi observado nenhum comportamento de corte do macho durante o período de pré-monta (estágios 1 e 2, Figura 4). Esse comportamento observado nos machos de *H. betulinus* foi similar a de machos de *Oemona hirta* (Fabricius) (Wang & Davis 2005) e de muitas outras espécies de cerambicídeos (Hanks 1999), em que nenhum comportamento de corte é observado nos machos para atrair as fêmeas; (ii) Contato antenal: a fêmea caminhou em direção ao macho e tocou sua antena na antena dele (estágio 3, Figura 4); (iii) Monta: imediatamente após o contato antenal,

o macho montou a fêmea fez um giro de 180° e prendeu o pronoto ou élitro da fêmea com suas pernas anteriores (estágios 4 e 5, Figura 4). Os machos não demonstraram nenhum interesse pelas fêmeas até elas tocarem neles com as antenas, sugerindo que compostos químicos das fêmeas estão envolvidos no processo; (iv) Cópula: logo após a monta, o macho curvou o abdômen para conectar com a genitália da fêmea e consumou a cópula (estágio 6, Figura 4).

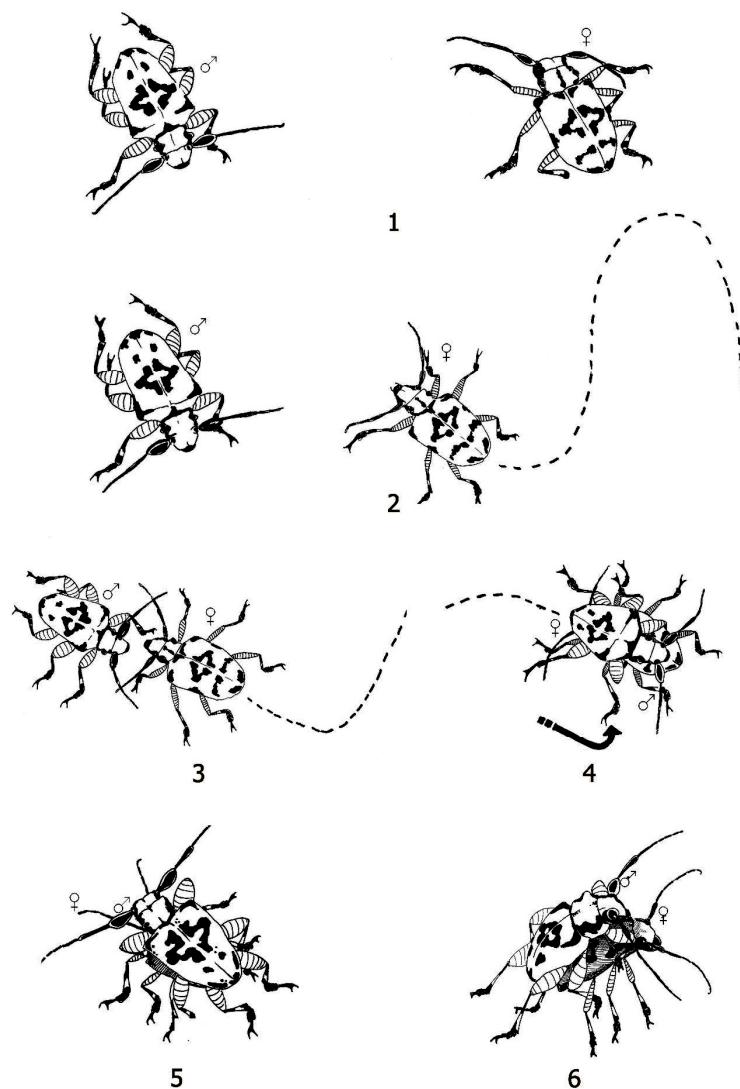


Figura 4. Sequência do comportamento de acasalamento em *H. betulinus*. 1 – fêmea e macho a uma distância de 30 cm; 2 - fêmea aproxima-se do macho; 3 – fêmea toca a antena na antena do macho; 4 – macho monta a fêmea e faz giro de 180°; 5 – macho prende o pronoto ou élitro da fêmea com as pernas anteriores; 6 – cópula. (n=8).

Todas as fêmeas testadas foram receptivas e, muitas vezes, permaneceram imóveis durante a cópula ou caminharam lentamente a curtas distâncias, sem mover as antenas. Comportamentos similares foram observados in *Neoclytus mucronatus mucronatus* (Fabricius), *Megacyllene caryae* (Gahan) e *Megacyllene robiniae* (Forster) (Ginzel & Hanks 2003). Após a cópula, o macho de *H. betulinus* “guardou a fêmea”, permanecendo sobre ela durante um longo período. O mesmo foi observado para essa espécie em condições de campo por Guedes et al. (2000). Esse comportamento do macho “guardar a fêmea” já é conhecido em algumas espécies da subfamília Lamiinae, incluindo *Anoplophora chinensis* (Forster) (Wang et al. 1996b) e *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky) (Lance et al. 2003, Morewood et al. 2004), e tem sido explicado como sendo uma competição dos machos para fertilizar o maior número de ovos (Wang et al. 1996b, Hanks 1999, Alcock 2004).

Os resultados da sequência do comportamento de acasalamento de *H. betulinus* forneceram suporte para a hipótese que o reconhecimento de machos pelas fêmeas pode ser mediado por um feromônio produzido pelos machos ou por pistas visuais, e que machos reconhecem as fêmeas por um feromônio de contato.

As respostas de machos e fêmeas de *H. betulinus* no olfatômetro em Y, quando estimulados com diferentes fontes de odor, são mostradas na Tabela 1. As fêmeas foram significativamente atraídas para extratos de voláteis liberados pelos machos quando comparadas com o controle: 36 fêmeas escolheram extrato de macho e 8 escolheram o controle ($\chi^2 = 17,82$; g.l = 1; $P < 0,01$). Entretanto, os machos não foram atraídos significativamente para extratos de machos: 18 machos escolheram extratos de machos e 14 machos escolheram o controle ($\chi^2 = 0,50$; g.l = 1; $P = 0,60$). Por outro lado, os machos ($\chi^2 = 0,39$; g.l = 1; $P = 0,68$) e fêmeas ($\chi^2 = 0,23$; g.l = 1; $P = 0,75$) não foram atraídos significativamente para extrato de voláteis liberados pelas fêmeas. A atração

apenas das fêmeas para voláteis liberados pelos machos confirma que a comunicação entre *H. betulinus* é mediada inicialmente por um feromônio sexual produzido pelos machos.

Tabela 1. Respostas de machos e fêmeas de *H. betulinus* para extrato de voláteis de machos ou de fêmeas em olfatômetro em Y.

Fonte de Odor	Sexo	N	Resposta	Resposta (%)		P*
				Extrato	Hexano	
Extrato do macho vs.Hexano	Macho	57	32	56,25	43,75	0,60
	Fêmea	54	44	81,82	18,18	<0,05
Extrato da fêmea vs. Hexano	Macho	51	23	56,52	43,48	0,68
	Fêmea	54	39	53,85	46,15	0,75

*Diferenças estatisticamente significativas, Teste Qui-quadrado, $P < 0,05$

Os feromônios sexuais são importantes em muitas espécies de Cerambycidae, sendo geralmente utilizados para encontrar parceiro para o acasalamento (Hanks 1999, Allison et al. 2004). Por exemplo, feromônio sexual produzido pelos machos tem sido relatado em *Monochamus alternatus* Hope (Fauziah et al. 1987), *Anaglyptus subfasciatus* Pic (Nakamuta et al. 1994), *Hylotrupes bajulus* (Linné) (Fettköther et al. 1995), *A. glabripennis* (Zhang et al. 2002), *Steirastoma breve* (Sulzer) (Liendo et al. 2005), *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Fukaya et al. 2005), *Xylotrechus quadripes* Chevrolat (Hall et al. 2006), *Tetropium fuscum* (F.) e *Tetropium cinnamopterum* Kirby (Silk et al. 2007).

Os cromatogramas dos voláteis obtidos de machos e fêmeas de *H. betulinus* mostraram a presença de três compostos produzidos somente pelos machos (Figura 5,

composto **A**, **B** e **C**), fornecendo suporte químico para a atividade biológica dos extratos do macho na atratividade de fêmeas no olfatômetro.

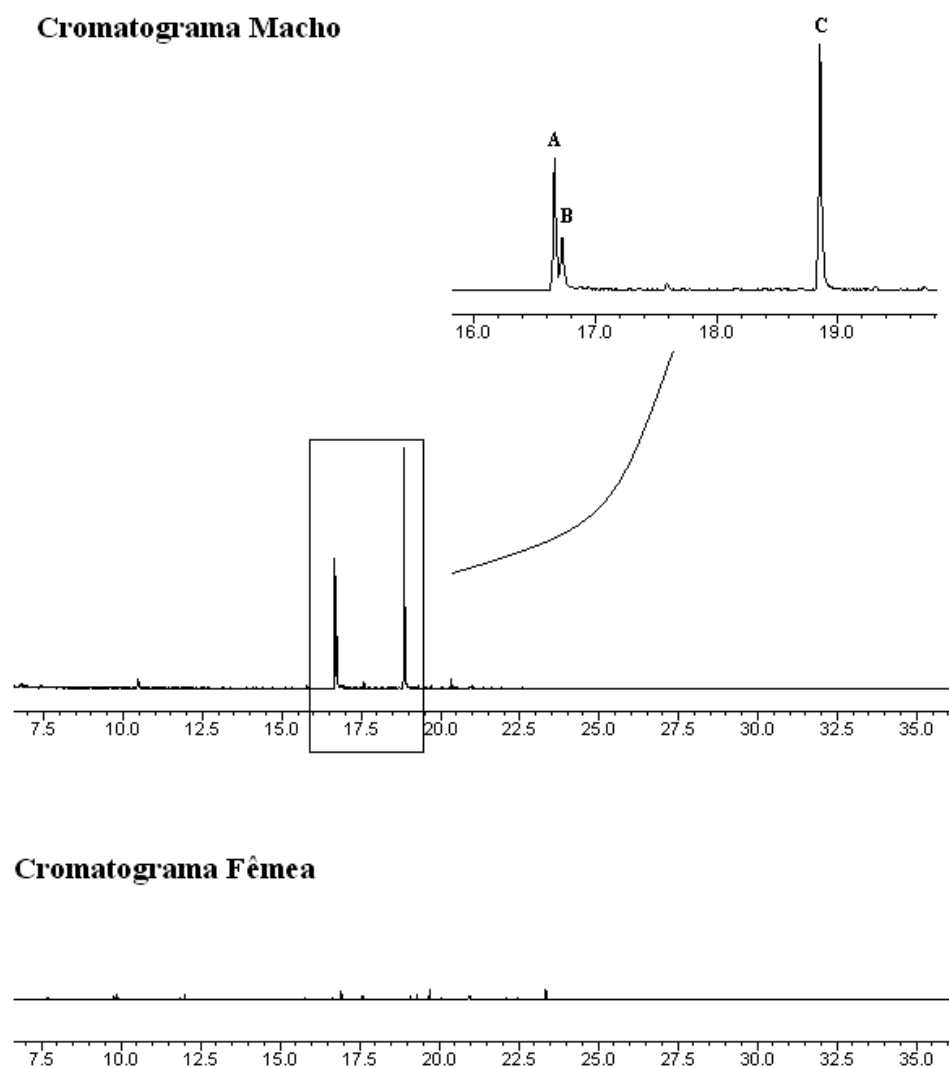


Figura 5. Análises cromatográficas dos voláteis obtidos de machos e fêmeas de *H. betulinus*, mostrando os três compostos macho-específicos (**A**, **B** e **C**).

Além disso, a sequência do comportamento de acasalamento em *H. betulinus* mostrou que nenhum macho aproximou-se da fêmea até que elas tocassem neles com suas antenas (Figura 4). Diversos autores argumentam que o contato antenal é comum

entre os besouros da família Cerambycidae (Michelsen 1966, Hughes 1981, Akutsu & Kuboki 1983, Kim et al. 1992, Hanks et al. 1996, Wang et al. 1996a, Lingafelter 1998, Dejjia et al. 1999, Hanks 1999) e que o reconhecimento das fêmeas pelos machos é mediado por feromônio de contato (Kim et al. 1993, Fukaya et al. 1996, 2000, Wang 1998, Ginzel et al. 2003). Por exemplo, machos de *M. alternatus* (Kim et al. 1992), *A. malasiaca* (Fukaya et al. 2000, Akino et al. 2001), *Psacothaea hilaris* (Pascoe) (Fukaya et al. 1996, 1997), *Hylotrechus colonus* (F.) (Ginzel et al. 2003), *N. m. mucronatus*, *M. caryae*, *M. robiniae* (Ginzel & Hanks 2003), *Dectes texanus texanus* LeConte (Crook et al. 2004), *Prionus californicus* Motschulsky (Barbour et al. 2007), *Monochamus galloprovincialis* (Olivier) (Ibeas et al. 2008, 2009) tiveram esse mesmo comportamento, sugerindo a presença de feromônio de contato na comunicação dessas espécies.

Os resultados do bioensaio em arena mostraram que todos os machos tentaram acasalar com fêmeas mortas ($\chi^2 = 20,00$; g.l = 1; $P < 0,05$) (Tabela 2), mas não responderam para as mesmas fêmeas após terem sido lavadas com hexano, sugerindo a evidência que fêmeas produzem um feromônio de contato que foi removido pelo solvente, e que o reconhecimento das fêmeas pelos machos não foi somente por pistas mecanorreceptoras. Porém, 14 dos 20 machos testados tentaram acasalar com as fêmeas mortas lavadas e impregnadas com o próprio extrato ($\chi^2 = 12,07$; g.l = 1; $P < 0,05$) (Tabela 2), sugerindo que há feromônio de contato envolvido no comportamento pré-copulatório do macho de *H. betulinus*.

Tabela 2. Respostas de machos de *H. betulinus* para fêmea morta, fêmea morta lavada e fêmea morta lavada impregnada com o próprio extrato.

Tratamentos	♂ atraídos	P
Fêmea morta	20	P < 0,001
Fêmea morta lavada	0	
Fêmea morta lavada tratada com extrato	14	P < 0,001

Os resultados encontrados neste capítulo demonstraram que a comunicação entre *H. betulinus* é mediada pela combinação de um feromônio sexual produzido pelo macho e um feromônio de contato produzido pela fêmea. Três compostos macho-específicos foram detectados em análises de CG e são os prováveis compostos do feromônio sexual dessa espécie. No próximo capítulo será abordada a identificação estrutural desses compostos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akino, T., Fukaya, H., Yasui, H. & Wakamura, S. 2001. Sexual dimorphism in cuticular hydrocarbons of the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Coleoptera: Cerambycidae). *Entomol. Sci.* 4: 271 - 277.
- Akutsu, K. & Kuboki, M. 1983. Analysis of mating behavior of udo longicorn beetle, *Acalolepta luxuriosa* Bates (Coleoptera: Cerambycidae). *Jap. J. Appl. Entomol. Zool.* 27: 247 - 251.
- Allison, J. D., Borden, J. H. & Seybold, S. J. 2004. A review of the chemical ecology of the Cerambycidae (Coleoptera). *Chemoecology* 14: 123 - 150.
- Alcock, J. 2004. Postinsemination associations between males and females in insects: The mate-guarding hypothesis. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 1 - 21.
- Ayres, M., Ayres, M. Jr., Ayres, D. L. & Santos, A. S. 2003. BioEstat3.0, Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém, Brasil, 290p.
- Baker, T. C. & Linn, C. E. 1984. Wind tunnels in pheromone research. In: *Techniques in pheromone research.* (Ed. By Hummel H E, Miller T H Springer-Verlag), New York, USA, pp. 75 - 110.
- Barbour, J. D., Lacey, E. S. & Hanks, L. M. 2007. Cuticular hydrocarbons mediate mate recognition in a species of longhorned beetle (Coleoptera: Cerambycidae) of the primitive subfamily prioninae. *Ann. Entomol. Soc. AM.* 100: 333 - 338.

- Brandão Filho, J. S. 1945. Uma broca do mate. Boletim Agrícola Secção Formação Agrícola. Curitiba. 3, p. 55 - 58.
- Cassanello, A. M. L. 1993. Ciclo de vida e aspectos morfológicos de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera, Cerambycidae, Lamiinae), broca-da-erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Dissertação de Mestrado, universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- Crook, D. J., Hopper, J. A., Ramaswamy, S. B. & Higgins, R. A. 2004. Courtship behavior of the soybean stem borer *Dects texanus texanus* (Coleoptera: Cerambycidae): Evidence for a female contact sex pheromone. Ann. Entomol. Soc. Am. 97: 600 - 604.
- Dejia, L., Masahiko, T. & Nacashima, T. 1999. Mechanisms of mating action of *Anoplophora glabripennis* (Motsch.). J. Beijing Forest Univ. 21: 33 - 36.
- Fauziah, B. A., Hidaka, T. & Tabata, K. 1987. The reproductive behavior of *Monochamus alternatus* Hope (Coleoptera: Cerambycidae). Appl. Entomol. Zool. 22: 272 - 285.
- Fettköther, R., Dettner, K., Schröder, F., Meyer, H., Francke, W. & Noldt, U. 1995. The male pheromone of the old house borer *Hylotrupes bajulus* (L.) (Coleoptera: Cerambycidae): Identification and response. Experientia 51: 270 - 277.
- Fukaya, M. & Honda, H. 1992. Reproductive biology of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae). I. Male mating behaviors and female sex pheromone. Appl. Entomol. Zool. 27: 89 - 97.

- Fukaya, M., Yasuda, T., Wakamura, S. & Honda, H. 1996. Reproductive biology of the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotheta hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae). III. Identification of contact sex pheromone on female body surface. J. Chem. Ecol. 22: 259 - 270.
- Fukaya, M., Wakamura, S., Senda, S., Omata, T. & Fukusaki, E. 1997. Sex pheromonal activity of geometric and optical isomers of synthetic contact pheromone to males of the yellow spotted longicorn beetle, *Psacotheta hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae). Appl. Entomol. Zool. 32: 654 – 656.
- Fukaya, M., Akino, T., Yasuda, T., Wakamura, S., Satoda, S. & Senda, S. 2000. Hydrocarbon components in contact sex pheromone of the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae), and pheromonal activity of synthetic hydrocarbons. Entomol. Sci. 3: 211 - 218.
- Fukaya, M., Yasui, H., Yasuda, T., Akino, T. & Wakamura, S. 2005. Female orientation to the male in the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae) by visual and olfactory cues. Appl. Entomol. Zool. 40: 63 - 68.
- Ginzel, M. D., Blomquist, G. J., Millar, J. G. & Hanks, L. M. 2003. Role of contact pheromones in mate recognition in *Xylotrechus colonus*. J. Chem. Ecol. 29: 533 - 545.
- Ginzel, M. D. & Hanks, L. M. 2003. Contact pheromones as mate recognition cues of four species of longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). J. Insect. Behav. 16: 181 - 187.

- Guedes, J. V. C., D'Avila, M. & Dornelles, S. H. B. 2000. Comportamento de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) em erva-mate em campo. *Ciência Rural*, Santa Maria 30: 1059 - 1061.
- Hall, D. R., Cork, A., Phythian, S. J., Chittamuru, S., Jayarama, B. K., Venkatesha, M. G., Sreedharan, K., Vinod Kumar, P. K., Seetharama, H. G. & Naidu, R. 2006. Identification of components of male-produced pheromone of coffee white stemborer, *Xylotrechus quadripes*. *J. Chem. Ecol.* 32: 195 - 219.
- Hanks, L. M., Millar, J. G. & Paine, T. D. 1996. Mating behavior of the eucalyptus longhorned borer (Coleoptera: Cerambycidae) and the adaptive significance of long "horns". *J. Insect. Behav.* 9: 383 - 393.
- Hanks, L. M. 1999. Influence of the larval host plant on reproductive strategies of cerambycid beetles. *Ann. Rev. Entomol.* 44: 483 - 505.
- Hughes, A. L. 1981. Differential male mating success in the white spotted sawyer, *Monochamus scutellatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 74: 180 - 184.
- Ibeas, F., Díez, J. J. & Pajares, J. A. 2008. Olfactory sex attraction and mating behaviour in the pine Sawyer *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae). *J. Insect. Behav.* 21: 101 - 110.
- Ibeas, F., Gemenio, C., Díez, J. J. & Pajares, J. A. 2009. Female recognition and sexual dimorphism of cuticular hydrocarbons in *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae). *Ann. Ent. Soc. Am.* 102: 317 - 325.

- Iede, E. T. 1985. Considerações sobre a entomofauna da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais – Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Embrapa/CNPQ. 146p.
- Kim, G. H., Takabayashi, J., Takahashi, S. & Tabata, K. 1992. Function of pheromones in mating behavior of the Japanese pine sawyer beetle, *Monochamus alternatus* Hope. Appl. Entomol. Zool. 27: 489 - 497.
- Kim, G., Takabayashi, J., Takahashi, S. & Tabata, K. 1993. Function of contact pheromone in the mating behavior of the cryptomeria bark borer, *Semanotus japonicus* Lacordaire (Coleoptera: Cerambycidae). Appl. Entomol. Zool. 28: 525 - 535.
- Lance, D. R., Wang, B., Xu, Z., Mastro, V. C., Francese, J. A., Li, J. & Luo, Y. 2003. Activity patterns of adults *Anoplophora glabripennis* in China. In Fosbroke, S. L.C., and Gottschalk, K. W. (eds.), Proceedings, U. S. Department of Agriculture Interagency Research Forum on Gypsy Moth and Other Invasive Species, 15-18 January 2002, Annapolis, Maryland. USDA. Forest Service Northeastern Research Station General Technical Report NE-300, p.52.
- Liendo, C., Morilio, F., Sánchez, P., Muñoz, W., Guerra, J., Cabrera, A. & Hernández, J. V. 2005. Olfactory behavior and electroantennographic responses of the cocoa beetle, *Steirastoma breve* (Coleoptera: Cerambycidae). Fla. Entomol. 88: 117 - 122.
- Lingafelter, S. W. 1998. Observations of interactive behavior in *Parandra glabra* (Coleoptera: Cerambycidae). Entomol. News. 109: 75 - 80.

- Mazuchowski, J. Z. 1991. Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Curitiba: Emater, pp. 104.
- Michelsen, A. 1966. The sexual behavior of some longhorned beetles (Col., Cerambycidae). Entomol. Meddelelser. 34: 329 - 355.
- Morewood, W. D., Neiner, P. R., Sellmer, J. C. & Hoover, K. 2004. Behavior of adult *Anoplophora glabripennis* on different tree species under greenhouse conditions. J. Insect. Behav. 17: 215 - 226.
- Nakamuta, K., Sato, H. & Nakashima, T. 1994. Behavioral and morphological evidence for male-produced sex pheromone in the Cryptomeria twig borer, *Anaglyptus subfasciatus* Pic (Coleoptera: Cerambycidae). Japanese. J. Entomol. 62: 371 - 376.
- Schlyter, F. & Birgersson, G. A. 1999. Forest beetles, pp. 113-148, in J. Hardie and A. K. Minks (eds.). Pheromones of Non-lepidopteran Insects Associated with Agricultural Plants. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Silk, P. J., Sweeney, J. & Wu, J. 2007. Evidence for a male-produced pheromone in *Tetropium fuscum* (F.) and *Tetropium cinnamopterum* (Kirby) (Coleoptera: Cerambycidae). Naturwissenschaften 94: 697 - 701.
- Solomon, J. D. 1995. Guide to insect borers of North American broadleaf trees and shrubs. Agriculture Handbook 706, USDA Forest Service, Washington, DC, pp.735.
- Wang, Q., Chen, L., Li, J. & Yin, X. 1996a. Mating behavior of *Phytoecia rufiventris* Gautier (Coleoptera: Cerambycidae). J. Insect. Behav. 9: 47 - 60.

- Wang, Q., Chen, L. Y., Zeng, W. Y. & Li, J. S. 1996b. Reproductive behavior of *Anoplophora chinensis* (Foster) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae), a serious pest of citrus. *Entomologist* 115: 40 - 49.
- Wang, Q. 1998. Evidence for a contact female sex pheromone in *Anoplophora chinensis* (Foster) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae). *Coleopt. Bull.* 52: 363 - 368.
- Wang, Q. & Davis, L. K. 2005. Mating behavior of *Oemona hirta* (F.) (Coleoptera: Cerambycidae) in laboratory conditions. *J. Insect. Behav.* 18: 187 - 191.
- Zarbin, P. H. G., Ferreira, J. T. B. & Leal, W. S. 1999. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônio de insetos. *Química Nova* 22: 263 - 268.
- Zarbin, P. H. G. 2001. Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos. In: *Feromônio de Insetos: Biologia, Química e Emprego no Manejo de Pragas* (2a ed. Ed. Vilela, E. F., Della-Lucia, M. C), Holos, Ribeirão Preto, Brasil, pp. 45 - 50.
- Zarbin, P. H. G., Arrigoni, E. B., Reckziegel, A., Moreira, J. A., Baraldi, P. T. & Vieira, P. C. 2003. Identification of male-specific chiral compound from the sugarcane weevil *Sphenophorus levis*. *J. Chem. Ecol.* 29: 377 - 386.
- Zhang, A., Oliver, J. E., Aldrich, J. R., Wang, B. & Mastro, V. C. 2002. Stimulatory beetle volatiles for the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Motschulaky). *Z.Naturforsch.* 57C:553—558.

Capítulo II

**Feromônio sexual produzido pelos machos de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825)
(Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae): Identificação estrutural, dinâmica de
produção e atividade biológica**

**Feromônio sexual produzido pelo macho de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825)
(Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae): Identificação estrutural, dinâmica de
produção e atividade biológica**

RESUMO

Análises cromatográficas dos voláteis obtidos de machos e fêmeas de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae) revelaram a existência de três compostos macho-específicos. Através de análises CG-MS e CG empregando-se colunas quirais, foram identificados o componente majoritário, o acetato de (*R*)-(-)-(*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ila, e dois componentes minoritários, a (*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona (geranil acetona) e o (*R*)-(-)-(*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ol numa proporção de 91,40: 7,90: 0,70, respectivamente. A liberação desses compostos é dependente do fotoperíodo e da presença da planta hospedeira. A liberação ocorreu principalmente durante a fotofase, mostrando um pico entre a 4 e 6 hora da mesma. A quantidade dos compostos diferiu quando os voláteis foram coletados na presença e ausência da planta hospedeira. Bioensaios em laboratório foram feitos para confirmar a atividade biológica dos compostos sintéticos do feromônio sexual do macho. A resposta comportamental das fêmeas para extrato de voláteis da planta hospedeira sozinha, compostos sintéticos racêmicos sozinhos e compostos sintéticos racêmicos mais extrato de voláteis da planta hospedeira em duas dosagens, mostrou que a presença dos voláteis da planta hospedeira aumentou a atratividade das fêmeas para o feromônio sexual produzido pelo macho.

Palavras-chave: Olfatômetro em Y, voláteis de planta, ritmo diário, sinergismo

Male-produced sex pheromone of *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae): identification, dynamics of production and biological activity

ABSTRACT

Chromatographic analyses of volatiles from *Hedypathes betulinus* males and females revealed the presence of three male-specific compounds. Through CG-MS and CG analysis employing chiral columns we identified the main component (*R*)-(-)-(*E*)-6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-acetate, and two minor components, (*E*)-6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-one (geranylacetone) and (*R*)-(-)-(*E*)-6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-ol in a ratio 91.40: 7.90: 0.70, respectively. Volatile release is dependent of photoperiod and the presence of host plant. The release occurred mainly during the photophase, showing a peak between 4 to 6 h, suggesting that the activity of this insect is predominantly daytime. The compounds amount differed significantly when volatiles were collected at the presence or absence of host plant. Olfactometer bioassays were conducted to confirm the biological activity of the synthetic compounds. The female behavioural response to plant volatiles extract alone, synthetic racemics alone and synthetic racemics plus plant volatiles extract in two dosages suggested that the presence of host plant volatiles increased female attractiveness towards the male pheromone.

KeyWords: Y olfactometer, host plant, diel periodicity, synergism

1. INTRODUÇÃO

A erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hilaire, 1920 (Aquifoliaceae) constitui uma atividade de grande importância nas regiões onde é cultivada, tanto do ponto de vista econômico quanto social. Em todo o sul do Brasil a principal praga relacionada a esta cultura é a broca-da-erva-mate, *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae). As larvas constroem galerias no sentido longitudinal dos troncos e galhos da planta, impedindo a circulação normal da seiva, resultando no depauperamento das erva-mates (Brandão Filho 1945, Mazuchowski 1991, Cassanello 1993). Atualmente, o método de controle mais utilizado para *H. betulinus* é o controle mecânico, através da catação dos adultos. Diante da dificuldade de controle, torna-se necessário o desenvolvimento de outras estratégias, como a utilização do feromônio em programas de manejo integrado dessa espécie.

Como demonstrado no capítulo I, a resposta comportamental de machos e fêmeas de *H. betulinus* para voláteis liberados por machos e fêmeas foi avaliada em laboratório utilizando-se um olfatômetro em Y. Apenas as fêmeas foram significativamente atraídas para os extratos de machos, sugerindo que a comunicação entre *H. betulinus* é mediada por um feromônio sexual. Para suportar esses dados comportamentais, três compostos macho-específicos foram detectados por meio de análises cromatográficas de voláteis liberados de machos e fêmeas, sugerindo serem estes os compostos responsáveis pela atração das fêmeas de *H. betulinus* (Fonseca & Zarbin 2009).

Diante disso, o objetivo deste capítulo foi identificar as estruturas químicas dos três compostos macho-específicos de *H. betulinus*, determinar a influência do fotoperíodo e da planta hospedeira na emissão do feromônio, e testar a atratividade das

fêmeas aos compostos sintéticos racêmicos sozinhos e em combinação com extrato de voláteis da planta hospedeira no laboratório.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Insetos

A obtenção e a manutenção em laboratório dos insetos utilizados nos experimentos deste capítulo seguiram os mesmos procedimentos adotados no capítulo I (página 26).

2.2. Identificação estrutural

Uma alíquota de 1 μ L dos extratos de machos foi injetada e analisada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-MS), modelo Shimadzu QP-5050A, equipado com uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm D. I. x 0,25 μ m de filme) (J & W Scientific, Folsom, Califórnia, EUA) com ionização por impacto de elétrons (70 eV). O CG-MS foi operado em modo splitless (250°C), com programação de temperatura de 50°C por 1 min, aumentando 7°C/min até 250°C, permanecendo nesta temperatura por 10 min. A linha de transferência operou a 270°C e o hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min. Os compostos **A**, **B**, **C** (Figura 5 – capítulo I, página 36) foram identificados por meio dos respectivos padrão de fragmentação, tempo de retenção, comparações com a biblioteca NIST do espectrômetro, Índice de Kovats e micro-derivatizações quando necessário. A síntese racêmica e enantioseletiva dos compostos macho-específicos foram desenvolvidas paralelamente (Diogo M. Vidal – Projeto IC – Laboratório de Semioquímicos – UFPR) e sendo estes compostos utilizados como padrões para co-injeção com o extrato natural, e também como tratamentos nos bioensaios comportamentais.

A estereoquímica absoluta dos compostos quirais foi atribuída através de cromatografia gasosa empregando-se coluna quiral HP-20B (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), com uma isoterma de 150°C e hélio como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min.

2.3. Dinâmica de emissão do feromônio

Para realização deste experimento foram feitas extrações dos voláteis de quatro machos através da técnica de aeração como descrito no tópico 2.3 do capítulo I (Página 28). Para avaliar a dinâmica de emissão do feromônio, os voláteis foram coletados a cada 12 h de fotofase e 12 h de escotofase ($n = 3$) e a cada 2 h durante a fotofase ($n = 3$). A fotofase teve início às 6 h da manhã. Para avaliar o efeito da planta hospedeira na liberação do feromônio, os voláteis foram coletados em intervalos de 24 h durante 3 dias ($n = 3$), na presença e ausência da planta hospedeira. Os ramos da erva-mate foram trocados a cada 2 dias e os extratos obtidos foram concentrados para 400 μ L (100 μ L para cada inseto).

Uma alíquota de 1 μ L de cada extrato foi injetada no cromatógrafo a gás como descrito no tópico 2.5 do capítulo I (Página 30). Os dados quantitativos da liberação dos voláteis pelos machos foram baseados na emissão do composto majoritário (**C**), através da integração da área do pico correspondente.

Uma curva padrão foi obtida utilizando tridecano (Aldrich Chemical Co) com as concentrações de 1, 10, 100, 500, 1000, 1500 e 2000 ppm, para auxiliar na quantificação do componente majoritário nos extratos dos machos na presença e ausência da planta hospedeira.

Os dados referentes à emissão de feromônio na presença e ausência da planta hospedeira, na fotofase e escotofase, e o período de máxima liberação do feromônio

foram avaliados estatisticamente usando ANOVA seguida pelo teste Tukey. Todas as análises foram feitas usando o programa BioEstat 3.0 (Ayres et al. 2003).

2.4. Bioensaios em olfatômetro

A resposta comportamental de fêmeas de *H. betulinus* para os compostos racêmicos sintéticos foi testada em um olfatômetro em Y, como descrito no tópico 2.4 do capítulo I (Página 29).

Foram conduzidos nove tratamentos: (i) papel filtro (2 x 2 cm) contendo 10 µL de extrato de voláteis da planta hospedeira versus controle; (ii) papel filtro contendo 5 µg do composto majoritário racêmico (C) versus controle; (iii) papel filtro contendo 8 µg do composto majoritário racêmico (C) versus controle; (iv) papel filtro contendo 5 µg do composto majoritário racêmico (C) mais 10 µL de extrato de voláteis da planta hospedeira versus controle; (v) papel filtro contendo 8 µg do composto majoritário racêmico (C) mais 10 µL de extrato de voláteis da planta hospedeira versus controle; (vi) papel filtro contendo 6 µg da mistura ternária racêmica A (5 µg: 0,43 µg: 0,038 µg) versus controle; (vii) papel filtro contendo 10 µg da mistura ternária racêmica B (8 µg: 0,69 µg: 0,06 µg) versus controle; (viii) papel filtro contendo 6 µg da mistura ternária racêmica A (5 µg: 0,43 µg: 0,038 µg) mais 10 µL de extrato de voláteis da planta hospedeira versus controle; (ix) papel filtro contendo 10 µg da mistura ternária racêmica B (8 µg: 0,69 µg: 0,06 µg) mais 10 µL de extrato de voláteis da planta hospedeira versus controle. A razão da mistura ternária usada no experimento foi a mesma razão previamente encontrada nos extratos obtidos na aeração: (91,40C: 7,90A: 0,70B). Os compostos sintéticos utilizados estavam na concentração de 1000 ppm. Como controle foi usado papel filtro impregnado com hexano.

Para cada experimento foram testadas pelo menos 30 fêmeas e cada indivíduo testado foi considerado como uma repetição. A fonte de odor foi trocada a cada fêmea

testada. Os experimentos foram realizados entre a quarta e nona hora da fotofase, quando os insetos estavam em maior atividade (veja resultados, Figura 12 e 13, Páginas 64 e 65). Cada indivíduo foi testado somente uma vez.

Os dados da resposta das fêmeas para os diferentes tratamentos no olfatômetro foram analisados pelo teste Qui-quadrado no programa BioEstat (Ayres et al. 2003). Os insetos que não escolheram nenhum dos braços foram excluídos da análise estatística.

2.5. Coleta dos voláteis da planta hospedeira

Extratos de voláteis da planta hospedeira usados no bioensaio em olfatômetro foram coletados através da técnica de aeração como descrito no tópico 2.3 do capítulo I (Página 28). Foram colocados 60 g de ramos novos de erva-mate nas câmaras de aeração (Figura 1) e após 24 h foi feita a dessorção dos compostos utilizando o solvente hexano. Os extratos foram concentrados para 600 μ L (10 g de ramos de erva-mate para 100 μ L). A cada 24 h os ramos da erva-mate foram trocados ($n = 4$).

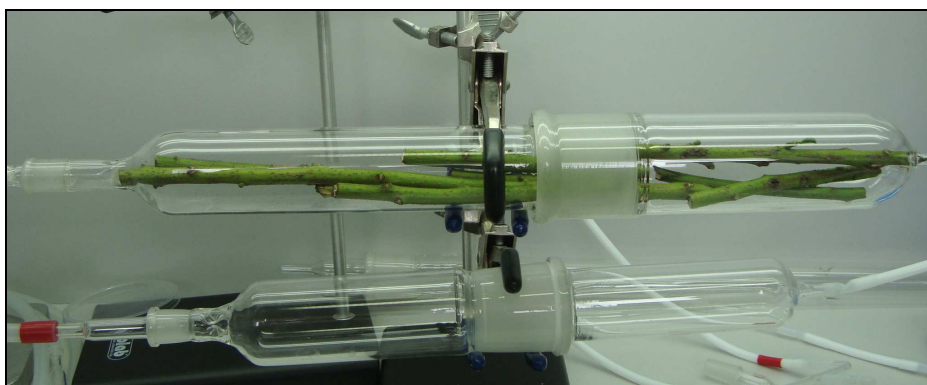


Figura 1. Câmaras de aeração com ramos da erva-mate para coleta de voláteis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação dos cromatogramas de voláteis obtidos de machos e fêmeas de *H. betulinus* indicou a presença de três compostos produzidos somente pelos machos (**A**, **B** e **C**) (Figura 2). O composto **C** é o composto majoritário da mistura e apresentou um tempo de retenção (t_R) igual a 18,84 min e índice de retenção de Kovats (KI) igual a 1573, seguido pelo composto **A** com t_R = 16,65 min e KI = 1448, e o composto **B** com t_R = 16,72 min e KI = 1454. A razão observada entre os compostos foi de 91,40: 7,90: 0,70.

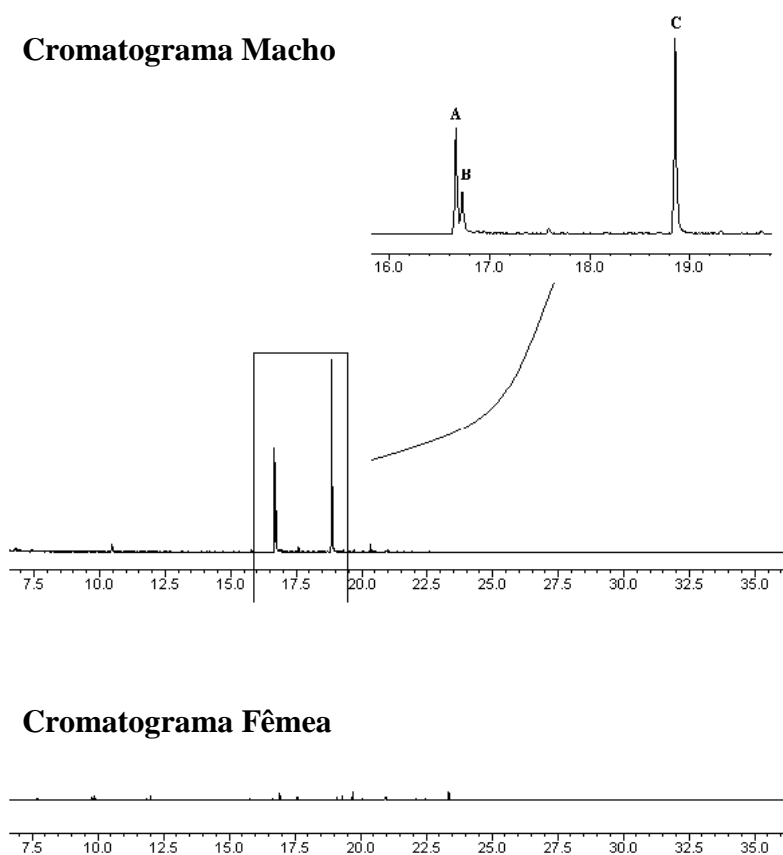


Figura 2. Análises cromatográficas dos voláteis obtidos de machos e fêmeas de *H. betulinus*, mostrando os três compostos macho-específicos (**A**, **B** e **C**).

O espectro de massas do composto **A** está demonstrado na figura 3, e apresenta o seguinte padrão de fragmentação: m/z (%) – 194 (1) M, 151 (6,5), 136 (5,2), 107 (7,6), 69 (27,4), 43 (100). A comparação desse componente com os compostos listados na biblioteca NIST do GC-MS, sugeriu fortemente tratar-se da estrutura da geranil acetona ou de seu isômero, a neril acetona. Após co-injeção destes padrões sintéticos comerciais, confirmou-se a estrutura desse composto como sendo a (*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona (geranil acetona), uma vez que apresentou o mesmo tempo de retenção e padrão de fragmentação do composto **A** presente nos extratos dos machos (Figura 4).

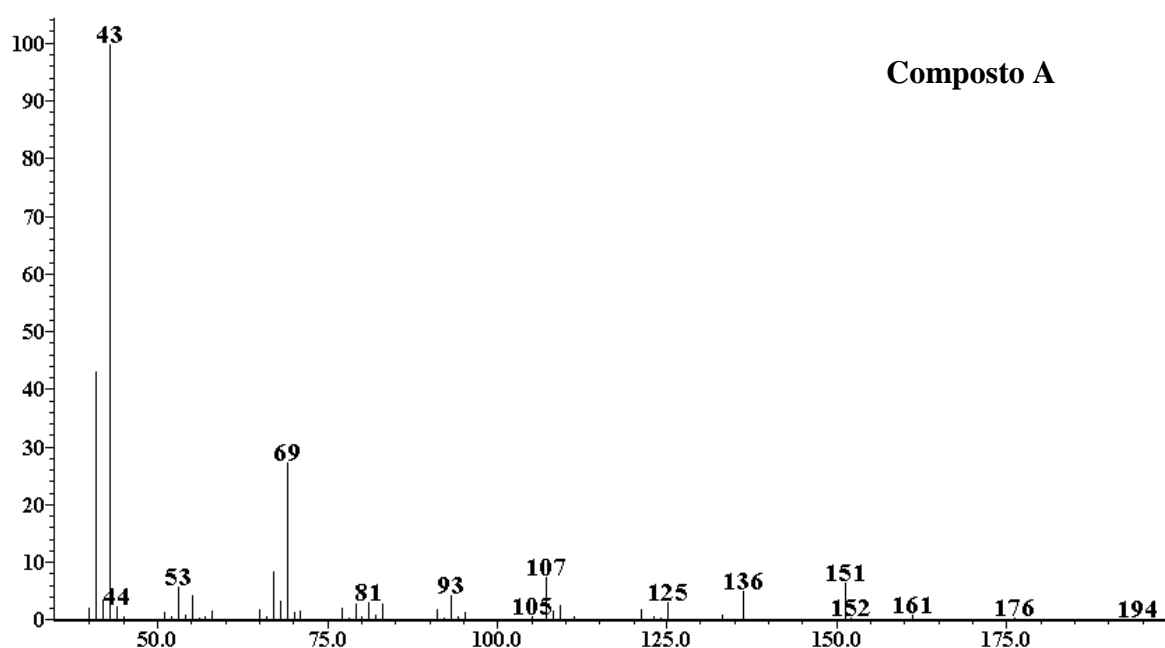


Figura 3. Espectro de massas do composto **A** do feromônio sexual de *H. betulinus*.

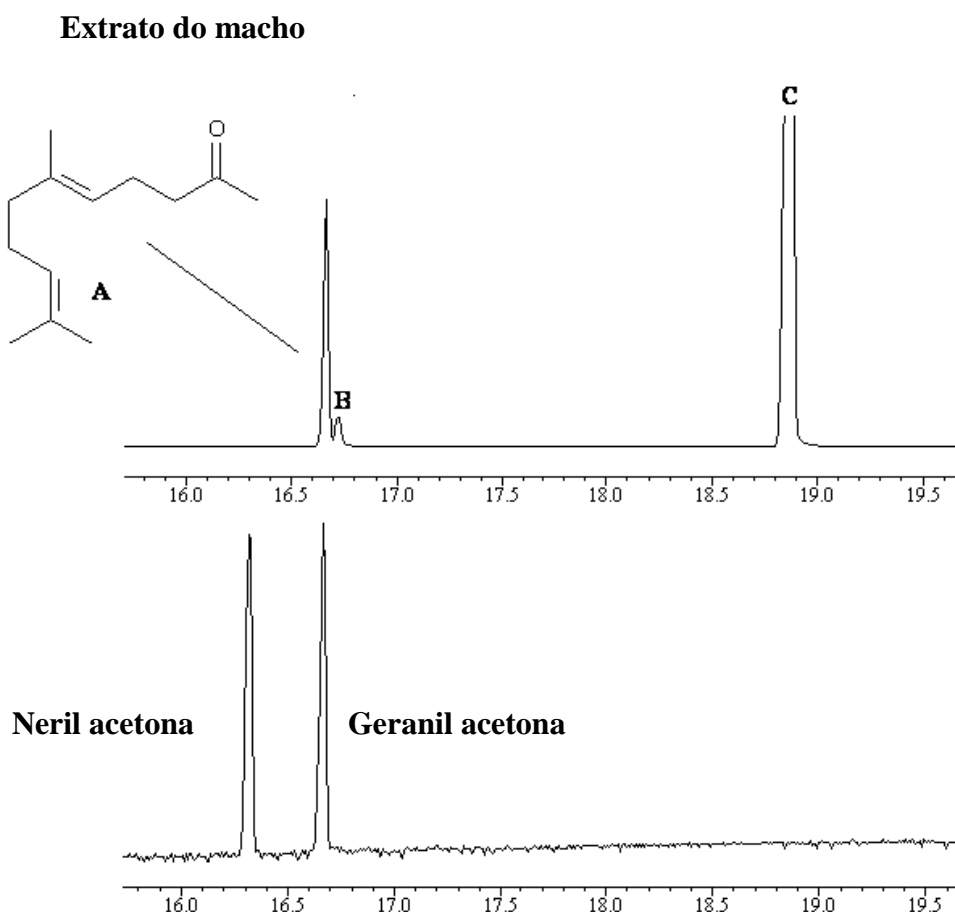


Figura 4. Comparação do tempo de retenção dos compostos comerciais neril acetona e geranyl acetona com o composto **A** presente no extrato natural dos machos de *H. betulinus*.

O espectro de massas do composto **B** apresentou pico do íon molecular m/z 196 e pico base m/z 41 (Figura 5). O padrão de fragmentação desse composto [m/z (%): 196 (1)M, 153 (14,5), 109 (30), 69 (64,9), 41(100)] foi relativamente semelhante ao encontrado na análise do composto **A**, apresentando uma variação em duas unidades de massa a mais no pico do íon molecular e em outros fragmentos. Este fato, adicionado ao tempo de retenção também bastante próximo, sugeriu duas possibilidades estruturais, as quais seriam diretamente derivadas da geranyl acetona (**A**): hidrogenação da dupla ligação em C5, formando a cetona (1), ou a redução da carbonila ao respectivo álcool (2) (Figura 6). Para verificar essas possibilidades, foi feita inicialmente a redução da

acetona (**A**) empregando-se hidreto de lítio alumínio (LiAlH_4) em THF, resultando no álcool correspondente. O álcool sintético apresentou tempo de retenção e um padrão de fragmentação idênticos ao produto natural de *H. betulinus*. Desta forma, confirmou-se a estrutura do composto **B** como sendo o álcool (*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ol. Esse composto já foi descrito como componente principal do feromônio sexual dos cerambicídeos *Tetropium fuscum* (F.) e *Tetropium cinnamopterum* Kirby, pertencentes à subfamília Spondylidinae, e é conhecido como fuscumol (Silk et al. 2007).

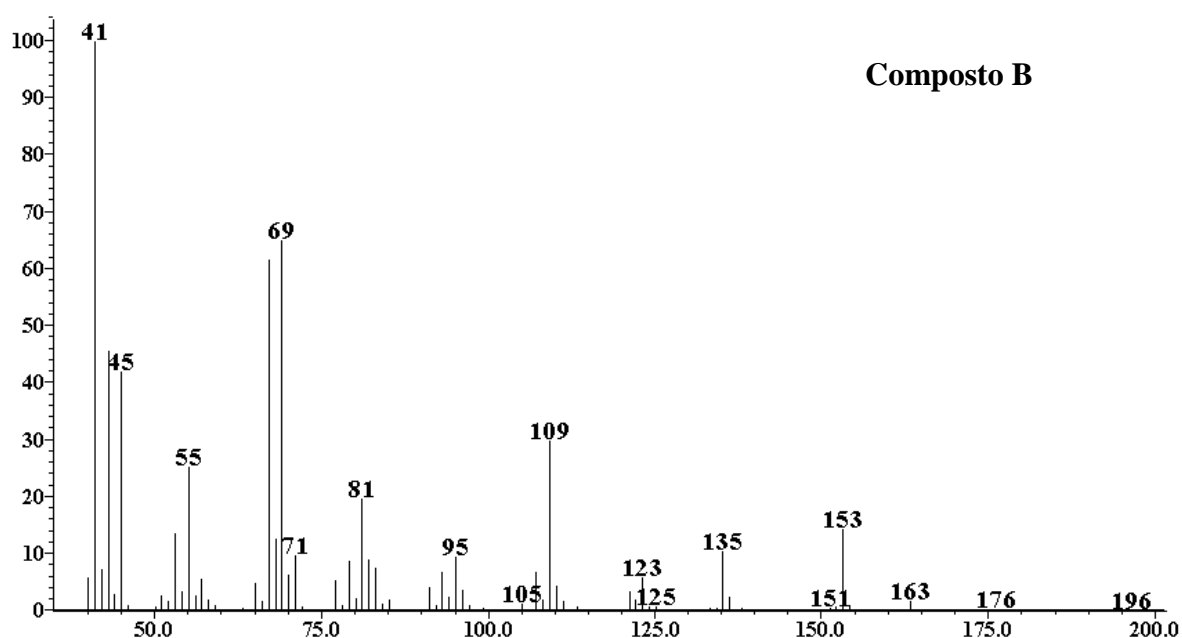


Figura 5. Espectro de massas do composto **B** do feromônio sexual de *H. betulinus*.



Figura 6. Duas possibilidades estruturais para o composto **B**.

O álcool (**B**) é uma molécula quiral podendo, dessa forma, apresentar dois estereoisômeros. Para que a configuração absoluta fosse determinada, o extrato natural foi comparado por cromatografia gasosa empregando-se coluna quiral, com padrões sintéticos racêmicos e dos isômeros (*R*) e (*S*), os quais foram obtidos através de resolução enzimática do álcool (**B**) com CAL-B (lipase de *Candida antártica*, Novozyme 435®) (Raminelli et al. 2004). A comparação dessas análises mostrou que o álcool natural (**B**) é encontrado nas duas formas enantioméricas, em uma proporção de 82,3 % (*R*) e 17,6 % (*S*) (Figura 7).

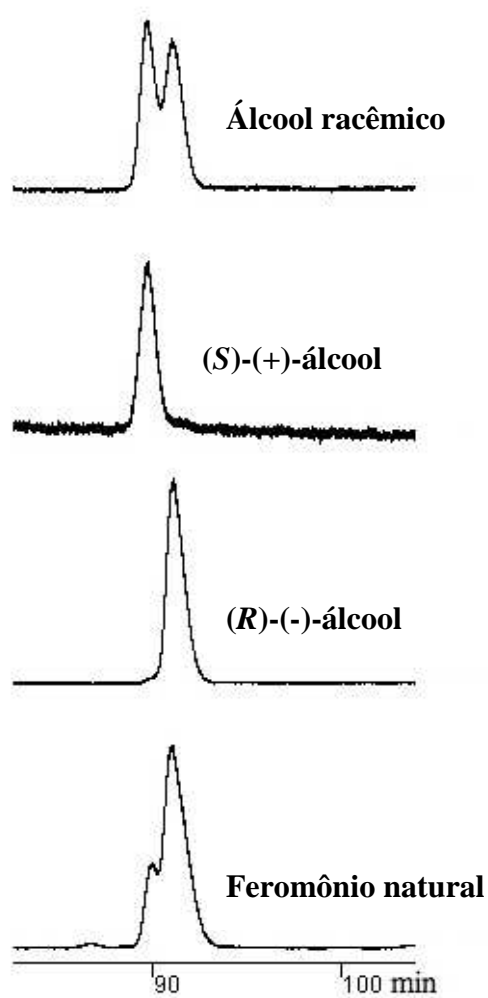


Figura 7. Análise comparativa em cromatografia gasosa para estabelecer a estereoquímica absoluta do álcool.

O espectro de massas do composto **C** apresentou as seguintes características: [m/z (%): 238(1)M, 178 (7,2), 109 (63,9), 69 (78), 43 (100)] (Figura 8). Em função desse padrão de fragmentação e do aumento significativo no tempo de retenção, foi postulado tratar-se do respectivo acetato derivado do composto **B**, haja vista, a diferença de 42 unidades de massas a mais observado no pico do íon molecular do composto **C**, em relação ao composto **B**, e a presença do fragmento característico da perda de uma molécula de ácido acético ($M^+ - 60$) m/z 178.

O acetato sintético foi então preparado a partir da acetilação da hidroxila do álcool **B** com anidrido acético e piridina (Ac_2O e Py) em dicloro metano (DCM). O produto dessa reação teve o mesmo tempo de retenção e padrão de fragmentação do pico **C** presente no extrato do macho de *H. betulinus*. Com isso, o composto **C** foi identificado como sendo um éster derivado do composto **B**, o acetato de (*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ila.

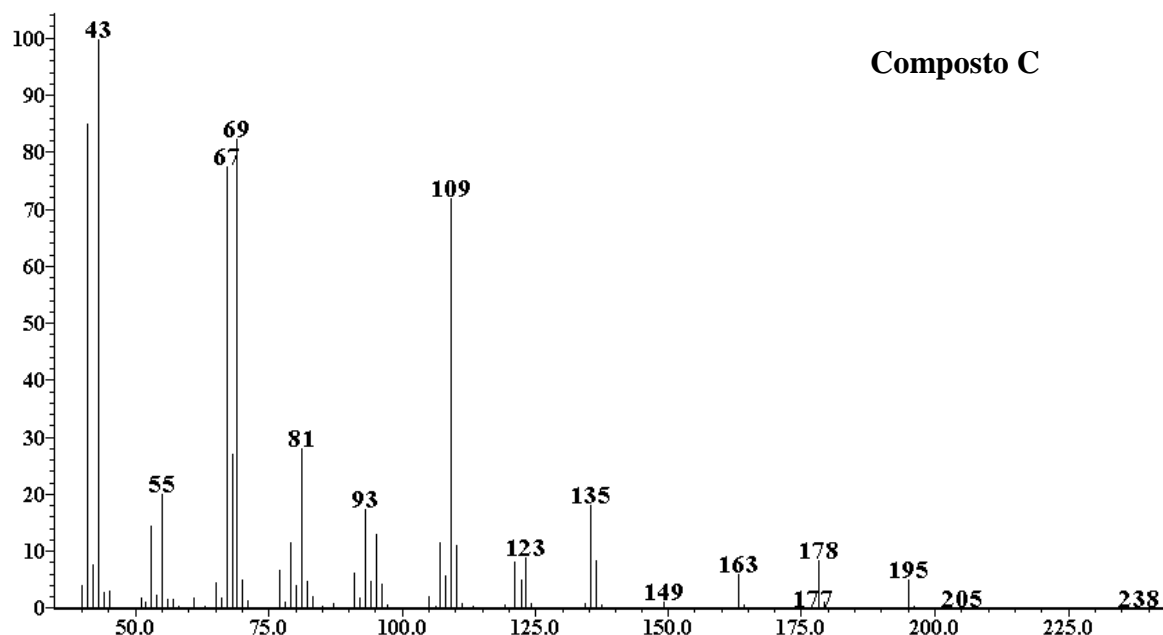


Figura 8. Espectro de massas do composto **C** do feromônio sexual de *H. betulinus*.

Assim como o álcool (composto **B**), o acetato também é uma molécula quiral e apresenta dois estereoisômeros. Para determinar a configuração absoluta do acetato, o extrato natural foi comparado por cromatografia gasosa empregando-se coluna quiral, com padrão sintético racêmico e dos isômeros sintéticos (*R*) e (*S*). Ressalta-se que esses componentes quirais também foram obtidos pela resolução enzimática do álcool (**B**) com CAL-B (Raminelli et al. 2004). A comparação dessas análises estabeleceu o produto natural como sendo um único isômero, o acetato de (*R*)-(-)-(*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ila (Figura 9).

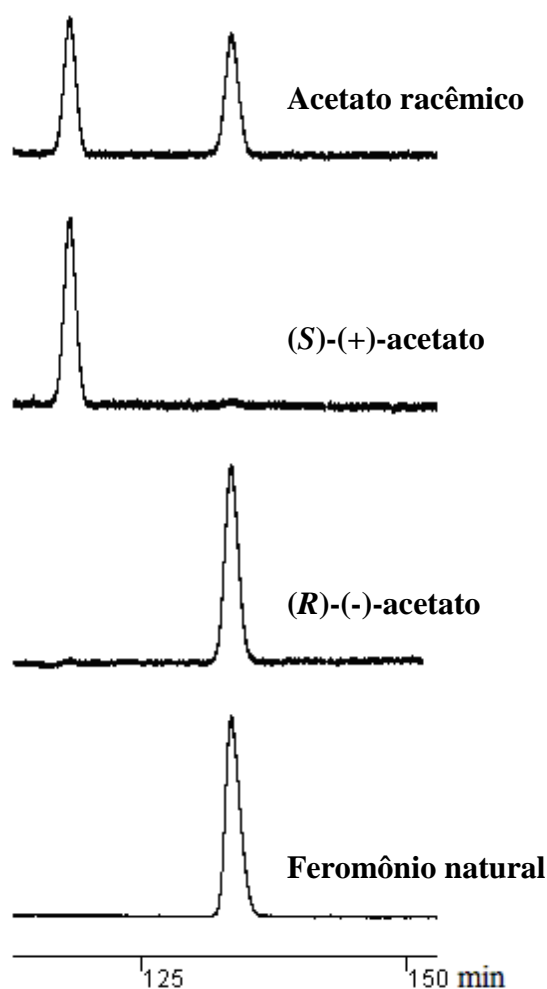


Figura 9. Análise comparativa em cromatografia gasosa para estabelecer a estereoquímica absoluta do acetato.

Com isso, as estruturas químicas dos três compostos presentes nos extratos dos machos de *H. betulinus* foram identificadas e estão apresentadas na figura 10. Apesar da configuração absoluta dos compostos **B** e **C** ter sido completamente determinada, não foi possível testá-los biologicamente por questão de tempo. Diante disso, apenas os compostos sintéticos racêmicos foram testados nos bioensaios de olfatômetro.

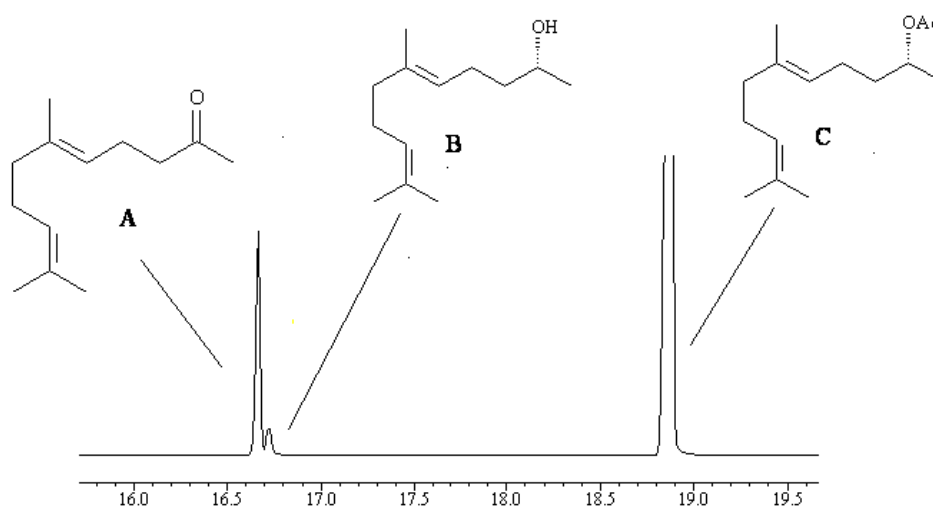


Figura 10. Identificação estrutural dos três compostos encontrados no extrato de machos de *H. betulinus*.

Com exceção do composto **B** que foi descrito como componente do feromônio sexual dos cerambicídeos *T. fuscum* e *T. cinnamopterum* (Silk et al. 2007), os outros dois compostos identificados para *H. betulinus* não foram descritos como componentes feromonais de nenhum outro cerambicídeo.

Como mostrado na revisão de literatura realizada nessa tese, a maioria dos feromônios identificados em cerambicídeos pertencem a espécies da subfamília Cerambycinae. Machos de várias espécies dessa subfamília produzem feromônio sexual e de agregação. Geralmente, os componentes do feromônio sexual e de agregação

apresentam estruturas similares e contém moléculas de cadeia curta (6 a 10 carbonos), com um grupo α -hidróxi cetonas e/ou (α , β -dióis) (Hanks et al. 2007, Lacey et al. 2008). Em alguns casos, os feromônios tem atraído as fêmeas a distâncias > 100 m (Lacey et al. 2004), demonstrando um grande potencial como ferramentas para detecção e manejo das espécies de cerambricídeos.

Dentro da subfamília Lamiinae foi identificado somente o feromônio de agregação produzido pelos machos de *Anoplophora glabripennis* Motschulsky, composto pela mistura de 4-(*n*-heptiloxi) butanal e 4-(*n*-heptiloxi) butan-1-ol. Essa mistura foi atrativa para ambos os sexos de *A. glabripennis* em olfatômetro (Zhang et al. 2002). Entretanto, o feromônio sexual produzido pelos machos não foi identificado para nenhuma espécie da subfamília Lamiinae (Hanks 1999, Fukaya et al. 2000, Reagel et al. 2002, Allison et al. 2004, Wen et al. 2007). Até o momento foi relatada apenas evidência de feromônio sexual produzido por machos de *Steirastoma breve* (Sulzer) (Liendo et al. 2005) e *Monochamus galloprovincialis* (Olivier) (Ibeas et al. 2008) em estudos de olfatômetro. Dessa forma, o feromônio sexual produzido pelos machos de *H. betulinus* foi o primeiro feromônio a ser identificado dentro da subfamília Lamiinae.

A produção dos compostos feromonais em *H. betulinus* mostrou-se dependente da presença da planta hospedeira. Na presença de ramos da erva-mate os machos liberaram significativamente mais voláteis ($344,2 \pm 86,5$ $\mu\text{g/inseto/dia}$) que os machos na ausência de ramos da erva-mate ($0,53 \pm 0,35$ $\mu\text{g/inseto/dia}$) ($F_{1,4} = 157,019$, $P < 0,05$) (Figura 11). A ausência da planta hospedeira foi fator limitante para a liberação dos compostos feromonais, sugerindo que os componentes da planta hospedeira estimulam a liberação do feromônio, como ocorre em muitas espécies de Coleoptera e Lepidoptera (Reddy & Guerrero 2004).

Os feromônios parecem ser produzidos em quantidades muito maiores (100 μg /macho ou mais) em espécies de cerambycídeos que usam o feromônio sexual produzido pelo macho, do que normalmente é observado em outras famílias de insetos (Millar et al. 2009). Assim, seria possível identificar um feromônio através de voláteis produzido por um único macho (Millar et al. 2009).

A grande quantidade de feromônio produzido pelo macho de *H. betulinus* na presença da planta hospedeira (Figura 11) simplificou a coleta dos voláteis através da técnica de aeração, sendo os componentes ativos facilmente detectados por CG-MS. Entretanto, em alguns casos, induzir machos a produzir feromônio em condições de laboratório nem sempre é fácil. Millar et al. (2009) fizeram aeração de machos de diversas espécies de cerambycídeos por vários dias, na presença e ausência da planta hospedeira, sob diferentes condições de temperatura e luz, e nenhum traço de feromônio foi detectado.

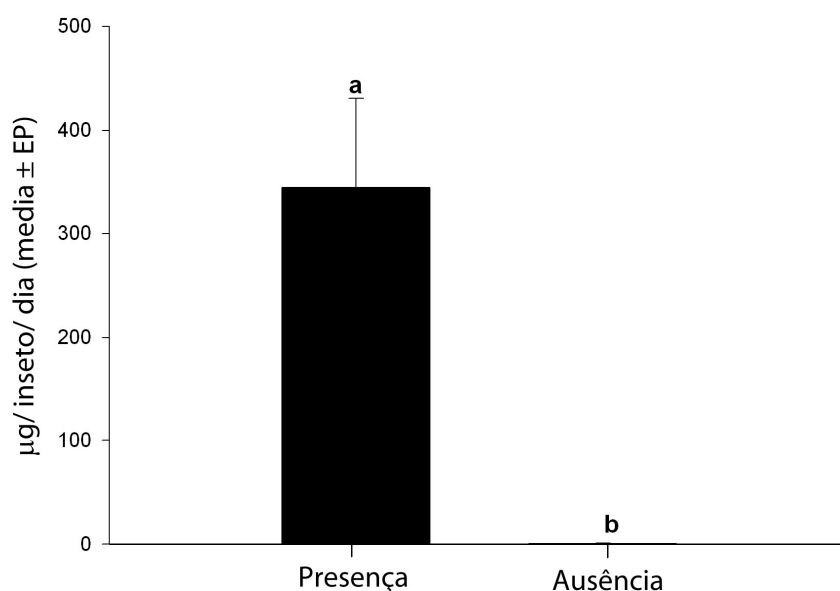


Figura 11. Quantidade (μg) de feromônio sexual liberado diariamente por machos de *H. betulinus* na presença e ausência de ramos da erva-mate. Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (teste Tukey; $P < 0,05$) ($n = 3$).

A liberação dos voláteis produzidos pelos machos de *H. betulinus* ocorreu principalmente durante a fotofase ($F_{1,4} = 14,928$, $P < 0,05$) (Figura 12), com período de máxima produção entre 4 a 6 h após o início da mesma (Figura 13). Após 6 h a produção começou a decrescer, atingindo o mesmo nível do início da fotofase ($F_{5,12} = 94,076$, $P < 0,001$) (Figura 13).

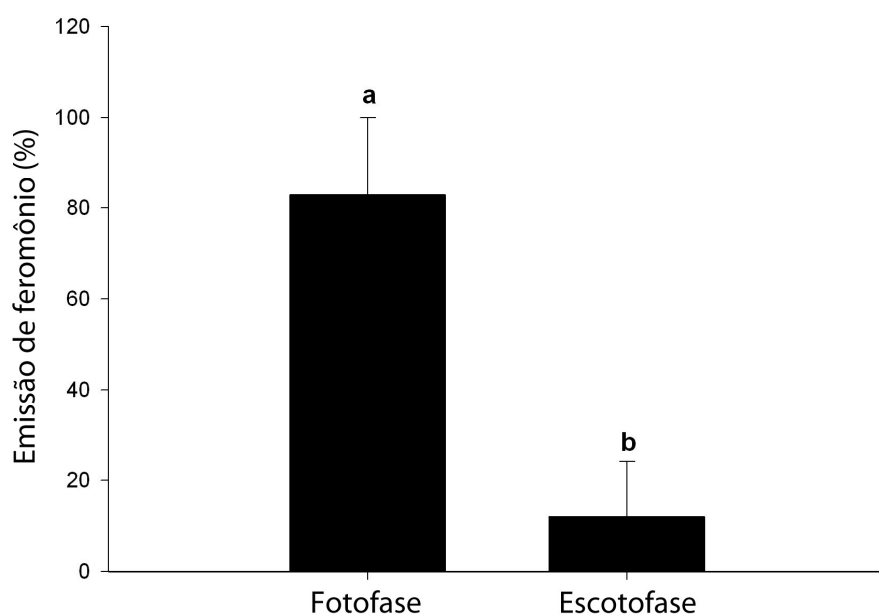


Figura 12. Porcentagem de feromônio sexual emitida por machos de *H. betulinus* na fotofase e na escotofase. Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (teste Tukey; $P < 0,05$) ($n = 3$).

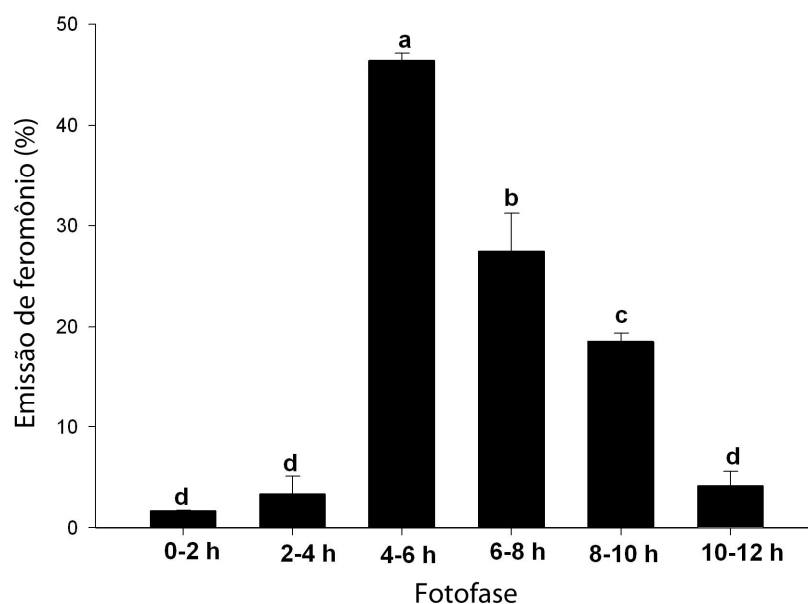


Figura 13. Porcentagem de feromônio sexual emitido por machos de *H. betulinus* durante toda a fotofase. Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (teste Tukey; $P < 0,05$) ($n = 3$).

A alta liberação de feromônio durante a fotofase sugere que a atividade do *H. betulinus* é predominante diurna. Esse resultado está em concordância com os resultados de Guedes et al. (2000), onde fêmeas e machos dessa espécie foram observados acasalando várias vezes durante o dia no campo. A produção do feromônio em *H. betulinus* não ocorre em uma taxa constante ao longo do dia e noite. Em vez disso, o feromônio é produzido ao longo de algumas horas durante o período de atividade reprodutiva diária. Deve-se ressaltar também, que a produção, liberação e percepção dos feromônios nos insetos dependem de fatores endógenos como idade, presença de co-específicos, condição reprodutiva e de uma ampla variedade de condições ambientais como planta hospedeira, temperatura, fotoperíodo, intensidade luminosa, umidade relativa e condições atmosférica (Lima & Della-Lucia 2001).

Testes em olfatômetro mostraram que as fêmeas de *H. betulinus* não foram atraídas significativamente para o composto majoritário na menor dosagem (5 µg) ($\chi^2 = 0,034$; g.l = 1; P = 0,85), na maior dosagem (8 µg) ($\chi^2 = 0,143$; g.l = 1; P = 0,71) nem para a mistura ternária A (menor dosagem) ($\chi^2 = 0,29$; g.l = 1; P = 0,59). Por outro lado, a mistura ternária B (maior dosagem) foi atrativa significativamente para as fêmeas ($\chi^2 = 5,452$; g.l = 1; P = 0,01) (Tabela 1).

Tabela 1. Número total de fêmeas de *H. betulinus* atraídas para racêmicos sintéticos ou hexano em olfatômetro em Y

Fontes de odores		♀ atraídas
Composto C x Hexano (5 µg)	Composto C	15
	Hexano	14
	Não resposta	7
	Total	36
Composto C x Hexano (8 µg)	Composto C	15
	Hexano	13
	Não resposta	8
	Total	36
Composto A + B + C x Hexano (5 µg + 0,43 µg + 0,038 µg)	Mistura ternária A	17
	Hexano	14
	Não resposta	7
	Total	38
Composto A + B + C x Hexano (8 µg + 0,69 µg + 0,06 µg)	Mistura ternária B	22*
	Hexano	9
	Não resposta	6
	Total	37

*Diferença estatisticamente significativa, Teste Qui-quadrado, P < 0,05.

Os resultados indicam que o composto majoritário não foi significativamente atrativo quando testado isoladamente. A mistura ternária B foi a principal responsável pela atratividade das fêmeas de *H. betulinus*, sugerindo que os compostos minoritários atuam de maneira sinérgica na atratividade. O fato da atração ter sido observada

somente para mistura ternária B, cujos componentes feromonais estavam presentes em maior quantidade pode estar associado à alta produção de feromônio na espécie.

A importância da natureza multicomponente dos feromônios na percepção dos feromônios pelos insetos já é bem documentado para os lepidópteros, e foi relatada para algumas espécies de cerambicídeos. Lacey et al. (2008) identificaram oito compostos macho-específicos de *Megacyllene caryae* (Gahan). Esses compostos sozinhos não foram atrativos, mas a mistura de todos os componentes foi atrativa para ambos os sexos em experimento de campo. A eliminação de qualquer um dos componentes resultou em declínio na captura nas armadilhas. Ray et al. (2009) identificaram o componente principal do feromônio de agregação de *Rosalia funebris* Motschulsky como sendo o (*E*)-2-hexenoato de (*Z*)-3-decenila e vários outros componentes minoritários. Apesar de ambos os sexos de *R. funebris* terem sido atraídos para armadilhas contendo apenas o composto majoritário, os autores sugerem que armadilhas contendo a mistura completa pode atrair um número maior de besouros.

Em contraste aos resultados mostrados na Tabela 1, um maior número de fêmeas foi atraído significativamente para a combinação de voláteis da planta com o composto majoritário nas 2 dosagens testadas, 5 µg ($\chi^2 = 7,529$; g.l = 1; P = 0,006) e 8 µg ($\chi^2 = 11,645$; g.l = 1; P = 0,0006). Da mesma forma, as 2 dosagens testadas da mistura ternária, A ($\chi^2 = 5,828$; g.l = 1; P = 0,015) e B ($\chi^2 = 9,783$; g.l = 1; P = 0,001) se mostraram igualmente atrativas quando combinadas aos voláteis das plantas (Tabela 2). Entretanto, o extrato de voláteis da planta hospedeira sozinha não atraiu significativamente as fêmeas ($\chi^2 = 0,133$; g.l = 1; P = 0,715) (Tabela 2).

Tabela 2. Número total de fêmeas de *H. betulinus* atraídas para extrato da planta hospedeira (PH) ou misturas de racêmicos sintéticos + extratos da planta hospedeira em olfatômetro em Y

Fontes de odor		♀ atraídas
PH x Hexano	PH	14
	Hexano	16
	Não resposta	13
	Total	43
Composto C (5 µg) + PH x Hexano	Composto C + PH	25*
	Hexano	9
	Não resposta	10
	Total	44
Composto C (8 µg) + PH x Hexano	Composto C + PH	25*
	Hexano	6
	Não resposta	5
	Total	36
Composto A + B + C + PH x Hexano (5 µg + 0,43 µg + 0,038 µg)	Mistura ternária A + PH	21*
	Hexano	8
	Não resposta	7
	Total	36
Composto A + B + C + PH x Hexano (8 µg + 0,69 µg + 0,06 µg)	Mistura ternária B + PH	19*
	Hexano	4
	Não resposta	6
	Total	29

*Diferenças estatisticamente significativas, Teste Qui-quadrado, $P < 0,05$.

Os resultados demonstraram claramente que as fêmeas foram atraídas significativamente para a fonte de odor que continha o feromônio mais extrato de voláteis da planta hospedeira do que as que continham apenas feromônio ou extrato de voláteis da planta hospedeira (Tabela 2). O composto majoritário por si só não exerceu atratividade efetiva, contudo a presença dos voláteis da planta promoveu uma ação sinergista e, com isso, atraiu maior número de fêmeas. O sinergismo entre feromônios e os odores da planta hospedeira ocorre em várias ordens de insetos, incluindo mariposas (Dickens et al. 1990, 1993a, b, Reddy & Guerrero 2000, Deng et al. 2004, Yang et al.

2004), besouros (Phillips et al. 1984, Byers et al. 1990, Nakamuta et al. 1997, Zhang & Schlyter 2003), e moscas (Landolt et al. 1992). Resultados similares de sinergismo entre o feromônio e voláteis da planta hospedeira dentro da família Cerambycidae foi relatado para *Anaglyptus subfasciatus* Pic (Nakamuta et al. 1997), *T. fuscum* e *T. cinnamopterum* (Silk et al. 2007). Em todos os casos, os componentes feromonais somente foram atrativos para essas espécies quando combinados com voláteis da planta hospedeira.

Estudos com várias espécies de cerambycídeos tem sugerido que os adultos, ao invés de usarem feromônio de longa distância, são atraídos pela a planta hospedeira para o acasalamento (Hanks 1999, Allison et al. 2004). Ginzel & Lawrence (2005) mostraram que a localização e reconhecimento de algumas espécies de cerambycídeos envolvem três estágios comportamentais: (1) ambos os sexos são independentemente atraídos para as plantas hospedeiras; (2) machos atraem fêmeas com feromônios de uma determinada distância; (3) machos reconhecem fêmeas pelo feromônio de contato produzido pelas fêmeas. A localização de parceiros em *H. betulinus* não envolve o estágio 1 como mostrado para outras espécies, visto que as fêmeas não foram atraídas significativamente para voláteis da planta hospedeira (Tabela 2). *H. betulinus* envolve apenas os estágios comportamentais 2 e 3, como já visto na sequência do comportamento dessa espécie no Capítulo I desta tese.

É importante ressaltar que a geranil acetona é o terceiro componente mais abundante identificado no óleo essencial das folhas da erva-mate (Tabela 3, Bastos et al. 2006). Diante dessa informação, há fortes indícios que a geranil acetona está presente também na composição dos voláteis dos ramos da erva-mate obtidos através da aeração. Como já visto anteriormente, esses voláteis da erva-mate, quando combinados com o componente majoritário nos testes de olfatômetro, atraíram significativamente as fêmeas de *H. betulinus* (Tabela 2). Esse efeito pode ser causado pela geranil acetona presente

nos voláteis da planta hospedeira. Isso corrobora com o resultado encontrado para a mistura ternária B (Tabela 1), a qual continha a geranil acetona sintética, que se mostrou atrativa para as fêmeas. Seria relevante testar a mistura binária (componente majoritário e geranil acetona), e assim provar o efeito sinérgico da geranil acetona na atração das fêmeas.

Tabela 3. Principais compostos presentes no óleo essencial da erva-mate

Composto	Erva-mate (%)
Limoneno	18,22
Linalol	12,16
Geranil acetona	7,05

Fonte: Bastos et al. 2006

Em função dos resultados encontrados até o momento, abre-se uma grande perspectiva do uso do composto majoritário racêmico combinado com voláteis da planta hospedeira ou a mistura ternária racêmica, combinada ou não com voláteis da planta hospedeira, como alternativa para serem empregados no manejo integrado de *H. betulinus*. Vale ressaltar que, apesar dos bons resultados com os compostos sintéticos racêmicos, seria importante testar a atividade do enantiômero natural (*R*) dos compostos **B** e **C**. Apesar de ser comum nos insetos o fato de somente um enantiômero ser bioativo e seu enantiômero não apresentar atividade antagonista (Corrêa 2007), já foi demonstrado para *Neoclytus mucronatus mucronatus* (Fabricius) (Coleoptera: Cerambycidae) que o enantiômero (*R*)-3- hidróxihexan-2-ona foi mais atrativo para ambos os sexos do que a mistura racêmica (Lacey et al. 2007). Pode ser que o mesmo ocorra para *H. betulinus*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allison, J. D., Borden, J. H. & Seybold, S. J. 2004. A review of the chemical ecology of the cerambycidae (Coleoptera). *Chemoecology* 14: 123 - 150.
- Ayres, M., Ayres, M. Jr., Ayres, D. L. & Santos, A. S. 2003. BioEstat3.0, Aplicações estatística nas áreas das ciências biológicas e médicas, Sociedade Civil Mamirauá, Belém, Brasil, 290p.
- Bastos, D. H. M., Ishimoto, E. Y., Marques, M. O. M., Ferri, A. F. & Torres, E. A. F. S. 2006. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 538 - 543.
- Brandão Filho, J. S. 1945. Uma broca do mate. *Boletim Agrícola Secção Formação Agrícola*. Curitiba, 3: 55 - 58.
- Byers, J. A., Birgersson, G., Lofqvist, J., Appelgren, M. & Bergstrom, G. 1990. Isolation of pheromone synergists of bark beetle, *Pityogenes chalcographus*, from complex insect-plant odors by fractionation and subtractive-combination bioassay. *J. Chem. Ecol.* 16: 861 - 876.
- Cassanello, A. M. L. 1993. Ciclo de vida e aspectos morfológicos de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera, Cerambycidae, Lamiinae), broca-da-erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Dissertação de Mestrado, Entomologia. Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, UFPR, pp. 59.

- Corrêa, A. G. 2007. Feromônios: Conceitos e aplicações no controle de pragas, PP. 19-39. In: Corrêa, A. G. & Vieira, P. C. (eds.) Produtos naturais no controle de insetos, 2º ed. Série de Textos da Escola de Verão em Química, Vol. III. EdUFSCar, São Carlos-SP.
- Deng, J. Y., Wei, H. Y., Huang, Y. P. & Du, J. W. 2004. Enhancement of attraction to sex pheromone of *Spodoptera exigua* by volatile compounds produced by host plants. J. Chem. Ecol. 30: 2037 - 2045.
- Dickens, J. C., Jang, E. B., Light, D. M. & Alford, A. R. 1990. Enhancement of insect pheromone responses by green leaf volatiles. Naturwissenschaften 77: 29 - 31.
- Dickens, J. C., Smith, J.W. & Light, D.M. 1993a. Green leaf volatiles enhance sex attractant pheromone of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lep.: Noctuidae). Chemoecology 4: 175 - 177.
- Dickens, J. C., Visser, J. H. & Van Der Pers, J. M. C. 1993b. Detection and deactivation of pheromone and plant odor components by the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). J. Insect Physiol. 39: 503 - 516.
- Fonseca, M.G. & Zarbin, P.H.G. 2009. Mating behaviour and evidence for sex-specific pheromones in *Hedypathes betulinus* (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae). J. Appl. 133: 695 - 701.

- Fukaya, M., Akino, Y., Yasuda, T., Wakamura, S., Satoda, S. & Senda, S. 2000. Hydrocarbon components in contact sex pheromone of the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera: Cerambycidae) and pheromonal activity of synthetic hydrocarbons. Entomol. Sci. 3: 211 - 218.
- Ginzel, M. D. & Hanks, L. M. 2005. Role of host plant volatiles in mate location for three species of longhorned beetles. J. Chem. Ecol. 31: 213 - 217.
- Guedes, J. V. C., D'Avila, M. & Dornelles, S. H. B. 2000. Comportamento de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) em erva-mate em campo. Ciência Rural 30: 1059 - 1061.
- Ibeas, F., Díez, J. J. & Pajares, J. A. 2008. Olfactory sex attraction and mating behaviour in the pine Sawyer *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera: Cerambycidae). J. Insect Behav. 21: 101 - 110.
- Hanks, L. M. 1999. Influence of the larval host plant on reproductive strategies of cerambycid beetles. Ann. Rev. Entomol. 44: 483 - 505.
- Hanks, L. M., Millar, J. G., Moreira, J. A., Barbour, J. D., Lacey, E. S., McElfresh, J. S., Reuter, F. R. & Ray, A. M. 2007. Using generic pheromone lures to expedite identification of aggregation pheromones for the cerambycid beetles *Xylotrechus nauticus*, *Phymatodes lecontei*, and *Neoclytus modestus modestus*. J. Chem. Ecol. 33: 889 - 907.

- Lacey, E. S., Ginzl, M. D., Millar, J. G. & Hanks, L. M. 2004. Male-produced aggregation pheromone of the cerambycid beetle *Neoclytus acuminatus acuminatus*. J. Chem. Ecol. 30: 1493 - 1507.
- Lacey, E. S., Moreira, J. A., Millar, J. G., Ray, A. M. & Hanks, L. M. 2007. Male-produced aggregation pheromone of the longhorned beetle *Neoclytus mucronatus mucronatus*. Entomol. Exp. Appl. 122: 171 - 179.
- Lacey, E. S., Moreira, J. A., Millar, J. G. & Hanks, L. M. 2008. A male-produced aggregation pheromone blend consisting of alkanediols, terpenoids, and an aromatic alcohol from the cerambycid beetle *Megacyllene caryae*. J. Chem. Ecol. 34: 408 - 417.
- Landolt, P. J., Reed, H. C. & Heath, R. R. 1992. Attraction of female papaya fruit fly (Diptera: Tephritidae) to male pheromone and host fruit. Environ. Entomol. 21: 1154 - 1159.
- Liendo, C., Morillo, F., Sánchez, P. & Muñoz, W. 2005. Olfactory behavior and electroantennographic responses of the cocoa beetle, *Steirastoma breve* (Coleoptera: Cerambycidae). Fla. Entomol. 88: 117 - 122.
- Lima, E. R. & Della Lucia, T. M. C. 2001. Biodinâmica dos feromônios, PP. 13-29. In: Vilela, E. F & Della Lucia, T. M. C. (eds) Feromônios de Insetos: Biologia, química e emprego no manejo de pragas (2ªed.). Holos Editora, Ribeirão Preto-SP.

- Mazuchowski, J. Z. 1991. Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Curitiba: Emater, pp. 104.
- Millar, J. G., Hanks, L. M., Moreira, J. A., Barbour, J. D. & Lacey, E. S. 2009. Pheromone chemistry of cerambycid beetles, pp. 52-79. In: chemical ecology of wood-boring insects. Ed by Nakamuta, K. & Millar, J. G. Forestry and Forest Products Research Institute, Japan.
- Nakamuta, K., Leal, W. S., Nakashima, T., Tokoro, M., Ono, M. & Nakanishi, M. 1997. Increase of trap catches by a combination of male sex pheromone and floral attractant in longhorn beetle. J. Chem. Ecol. 23: 1635 - 1640.
- Phillips, T. W., West, J. R., Foltz, J. L., Silverstein, R. M. & Lanier, G. N. 1984. Aggregation pheromone of the deodar weevil, *Pissodes nemeorensis* (Coleoptera: Curculionidae): isolation and activity of grandisol and grandisal. J. Chem. Ecol. 10: 1417 - 1423.
- Raminelli, C., Comasseto, J. V., Andrade, L. H. & Porto, A. L. M. 2004. Kinetic resolution of propargylic and allylic alcohols by *Candida antarctica* lipase (Novozyme 435). Tetrahedron Asymmetry 15: 3117 - 3122.
- Ray, A. M., Millar, J. G., McElfresh, J. S., Swift, I. P., Barbour, J. D. & Hanks, L. M. 2009. Male-produced aggregation pheromone of the cerambycid beetle *Rosalia funebris*. J. Chem. Ecol. 35: 96 - 103.

- Reagel, P. M., Ginzl, M. D. & Hanks, L. M. 2002. Aggregation and mate location in the red milkweed beetle (Coleoptera: Cerambycidae). *J. Insect Behav.* 15: 811 - 830.
- Reddy, G. V. P. & Guerrero, A. 2000. Behavioral responses of the diamond-back moth, *Plutella xylostella*, to green leaf volatiles of *Brassica oleracea* subsp. *capitata*. *J. Agric. Food. Chem.* 48: 6025 - 6029.
- Reddy G. V. & Guerrero, A. 2004. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends in Plant Science* 9: 253 - 261.
- Silk, P. J., Sweeney, J. & Wu, J. 2007. Evidence for a male-produced pheromone in *Tetropium fuscum* (F.) and *Tetropium cinnamopterum* (Kirby) (Coleoptera: Cerambycidae). *Naturwissenschaften* 94: 697 - 701.
- Zhang, A., Oliver, J. E., Aldrich, J. R., Wang, B. & Mastro, V. C. 2002. Stimulatory beetle volatiles for the Asian longhorned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky). *Z. Naturforsch.* 57C: 553 - 558.
- Zhang, Q. H. & Schlyter, F. 2003. Redundancy, synergism, and active inhibitory range of non-host volatiles in reducing pheromone attraction in European spruce bark beetle *Ips typographus*. *Oikos* 101: 299 - 310.
- Yang, Z., Bengtsson, M. & Witzgall, P. 2004. Host plant volatiles synergize response to sex pheromone in codling moth, *Cydia pomonella*. *J. Chem. Ecol.* 30: 619 - 629.

Wen, L., Wang, Q., Tian, M. Y., He, X. Z. & Zeng, X. L. 2007. Mate location and recognition in *Glenea cantor* (Fabr.) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae): roles of host plant health, female sex pheromone, and vision. Environ. Entomol. 36: 864 - 870.

Capítulo III

**Localização das glândulas de produção e estudo da biossíntese do feromônio sexual
do macho de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae:
Lamiinae)**

Localização das glândulas de produção e estudo da biossíntese do feromônio sexual do macho de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae)

RESUMO

A localização da região onde se localiza as glândulas produtoras e estudos preliminares sobre a biossíntese do feromônio sexual da principal praga da erva-mate, *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae) foram realizados. Os resultados mostraram que altas quantidades do feromônio foram detectadas na superfície do protórax do macho de *H. betulinus*, mostrando que as glândulas de feromônio estão localizadas nessa região do inseto. Foi detectada a presença de pequenos poros cuticulares distribuídos na superfície inteira do protórax de machos e fêmeas dessa espécie, através de análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), sugerindo que estes poros podem estar associados à liberação do feromônio. Um provável precursor biossintético do feromônio sexual de *H. betulinus* marcado com átomos de deutério (geranil acetona deuterada) foi incorporado pelo macho quando aplicado no protórax, confirmando que as glândulas produtoras responsáveis pela produção do feromônio estão localizadas no protórax, e que seu feromônio é biossintetizado a partir da geranil acetona.

Palavras-chave: MEV, biossíntese, precursor deuterado, glândulas de feromônio

Location of pheromone producing gland and biosynthesis of male *Hedypathes betulinus* sex pheromone (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae)

ABSTRACT

The location of the pheromone producing glands was determined and preliminary studies on biosynthesis of the sex pheromone of the yerba mate borer, *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae) were performed. Results showed high quantities of pheromone in the prothorax of the male *H.betulinus* suggesting that pheromone production glands are located in this region of the insect. The presence of small pores distributed throughout the prothorax was detected through scanning electron microscopy (SEM), suggesting that these pores are associated with pheromone release. A possible biosynthetic precursor of *H.betulinus* sex pheromone labeled with deuterium atoms (deuterate geranyl acetone) was incorporated by male when applied to prothorax, confirming that the glands responsible for pheromone production are located in the prothorax and its pheromone is biosynthesized from geranyl acetone.

Keywords: SEM, biosynthesis; deuterated precursor; pheromone glands

1. INTRODUÇÃO

Hedypathes betulinus (Klug, 1825) (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae) é considerada a principal praga da erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hilaire, 1920 (Aquifoliaceae), da região sul do Brasil. As larvas constroem galerias longitudinais nos galhos, que impedem a circulação normal da seiva, causando o enfraquecimento das plantas (Brandão Filho 1945, Mazuchowski 1991, Cassanello 1993).

A comunicação entre os adultos de *H. betulinus* é mediada inicialmente por feromônio sexual produzido pelos machos (Fonseca & Zarbin 2009). Três compostos macho-específicos foram detectados por meio de análises cromatográficas de voláteis liberados de machos e fêmeas, sugerindo serem estes os compostos responsáveis pela atração das fêmeas de *H. betulinus* (Fonseca & Zarbin 2009). Esses compostos foram identificados como sendo o acetato de (*R*)-(-)-(*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ila (majoritário), (*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona e o (*R*)-(-)-(*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ol (minoritários) (capítulo II).

Os feromônios produzidos por machos de diversas espécies de besouros da subfamília Cerambycinae são produzidos por glândulas localizadas no protórax dos machos e a emissão ocorre através de poros situados em depressões na cutícula (Ray et al. 2006, Lacey et al. 2007a). Um estudo morfológico de 65 espécies da subfamília Cerambycinae revelou que 49 espécies de 14 tribos apresentaram poros específicos nos machos, localizados na região do protórax, e que esses poros poderiam servir como uma indicação da região de produção dos feromônios (Ray et al. 2006).

Com isso, o objetivo deste capítulo foi verificar qual a localização das glândulas de feromônio nos machos de *H. betulinus*, e estudar aspectos preliminares sobre a sua biossíntese.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Insetos

A obtenção e a manutenção em laboratório dos insetos utilizados nos experimentos deste capítulo seguiram os mesmos procedimentos adotados no capítulo I (página 26).

2.2. Localização das glândulas produtoras de feromônio

O corpo do macho de *H. betulinus* foi dividido em cinco regiões na seguinte ordem: cabeça, protórax, élitro, meso + metatórax e abdômen como mostrado na Figura 1 (n = 4).

Para separar as partes do corpo foi utilizado um bisturi, e a cada região retirada, o bisturi era lavado e limpo com álcool. Esse experimento foi realizado durante a fotofase no período entre 4 a 6 h, período de máxima liberação do feromônio (Figura 12 e 13 – capítulo II, páginas 64 e 65). Em seguida, cada região do corpo foi imersa em 1 mL de hexano por 2 h. Os extratos das regiões do corpo de cada macho não foram combinados e foram concentrados para 100 µL utilizando gás argônio (Zarbin et al. 1999, Zarbin 2001). Em seguida, os extratos foram armazenados em freezer a - 20°C até serem utilizados para as análises. Uma alíquota de 1 µL do extrato de cada uma das regiões do corpo foi injetada no cromatógrafo a gás como descrito no tópico 2.5 do capítulo I (página 30). A quantidade do feromônio nos extratos foi baseada na integração da área do pico do composto majoritário.

As diferenças na quantidade de feromônio produzida em cada região do corpo do macho foram avaliadas estatisticamente usando ANOVA seguida pelo teste Tukey. As análises foram feitas usando o programa BioEstat 3.0 (Ayres et al. 2003).

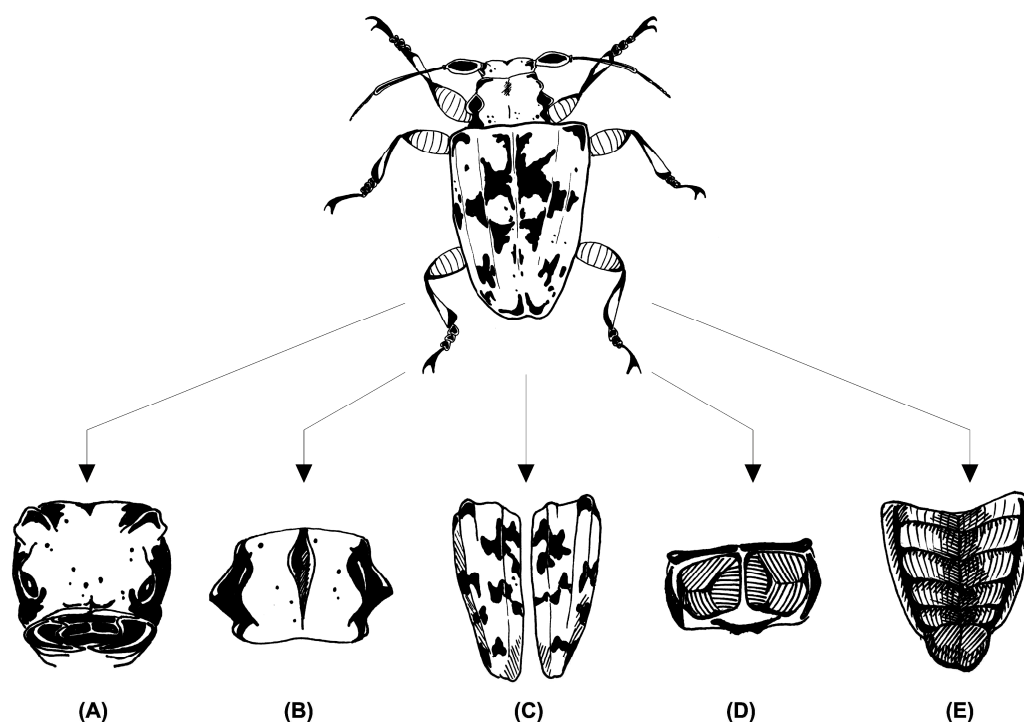


Figura 1. Macho de *H. betulinus* dividido em cabeça (A), protórax (B), élitros (C), meso + metatórax (D) e abdômen (E) (n=4).

Em seguida, foi feito um estudo morfológico da superfície externa da parte do corpo do inseto, onde a maior produção de feromônio foi detectada, empregando-se microscopia eletrônica de varredura (MEV). O material foi preparado para MEV seguindo o procedimento descrito por Ray et al. (2006). As estruturas foram imersas durante toda a noite em uma solução de Triton X 100 a 4% (Amresco) para remoção de restos de tecidos, e em seguida submersas em etanol a 70% e 95% por 5 min cada para desidratação. Resíduos de lipídeos foram retirados pela imersão do material em hexano (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) durante 2 h e em seguida foi feita uma sonicação em hexano por 30s. O material foi seco em estufa a 50°C por 24 h e em seguida revestido com 0,6 nm de ouro (Balzers Union, Alemanha). Foram feitas fotografias em vista lateral, ventral e dorsal do protórax do macho e da fêmea utilizando um microscópio

eletrônico de varredura modelo Jeol JSM 6360 LV, operado em 15 KV, no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

2.3. Aplicação do precursor deuterado e extração do feromônio

Foram preparadas soluções contendo 22 mg do precursor deuterado utilizado, em 290 μ L de acetona. Desta solução, 10 μ L foi topicamente aplicado no protórax do inseto vivo, região de maior produção do feromônio (Figura 2A). Após 4 h, os insetos vivos foram anestesiados por 15 min em freezer e o protórax foi cortado (Figura 2B) e colocado em 1 mL de hexano por 15 min, para extração do feromônio (Figura 2C). Os extratos foram concentrados para 100 μ L, injetando-se 1 μ L para as análises de CG-MS, como descrito no tópico 2.2 do capítulo II (página 50). Em seguida foi analisado o espectro de massas do feromônio produzido após a aplicação do precursor deuterado.

O precursor deuterado utilizado foi a geranil acetona D5, a qual foi obtido de acordo com o procedimento descrito por Gäbler & Boland (1991) (Figura 3). A formação do produto desejado foi confirmada pela análise do espectro de massas, onde pode ser observado a presença de cinco átomos de deutério (Figura 4).

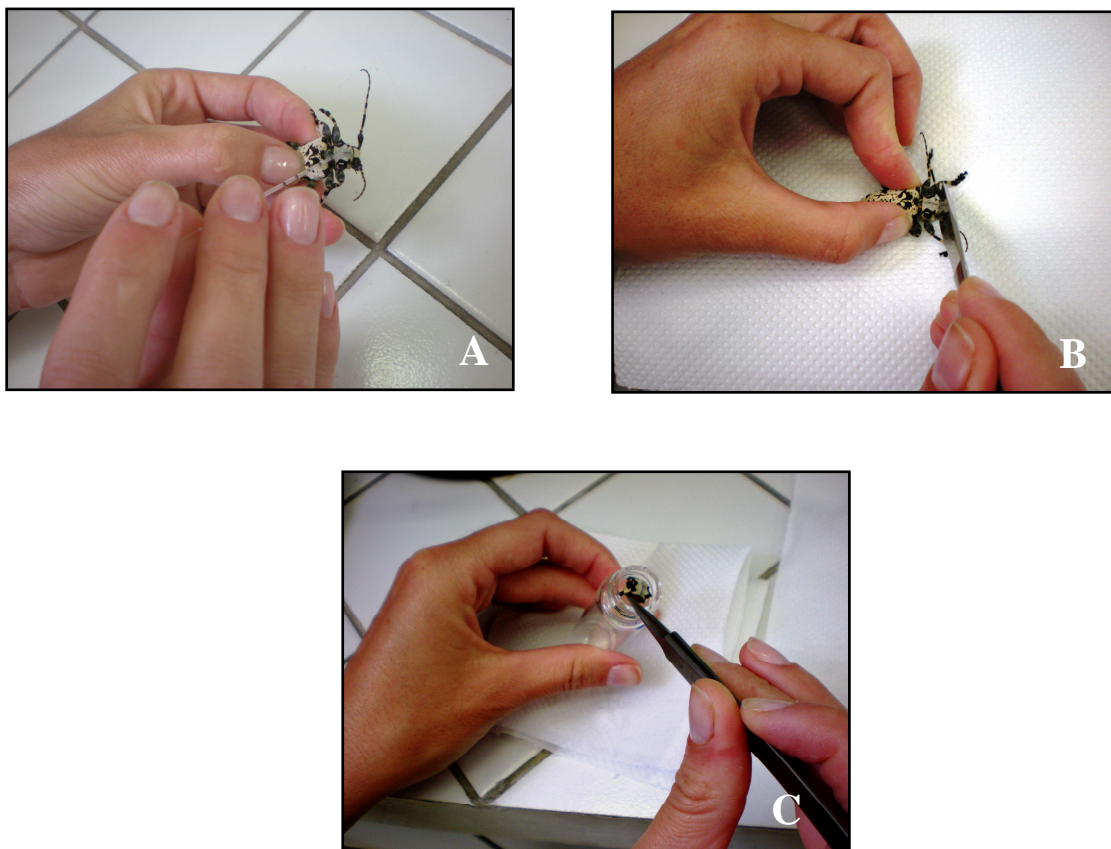


Figura 2. A – Aplicação do precursor deuterado no protórax; B – Corte do protórax após 4h de aplicação e C – Extração em solvente (hexano).



Figura 3. Obtenção da geranyl acetona deuterada.

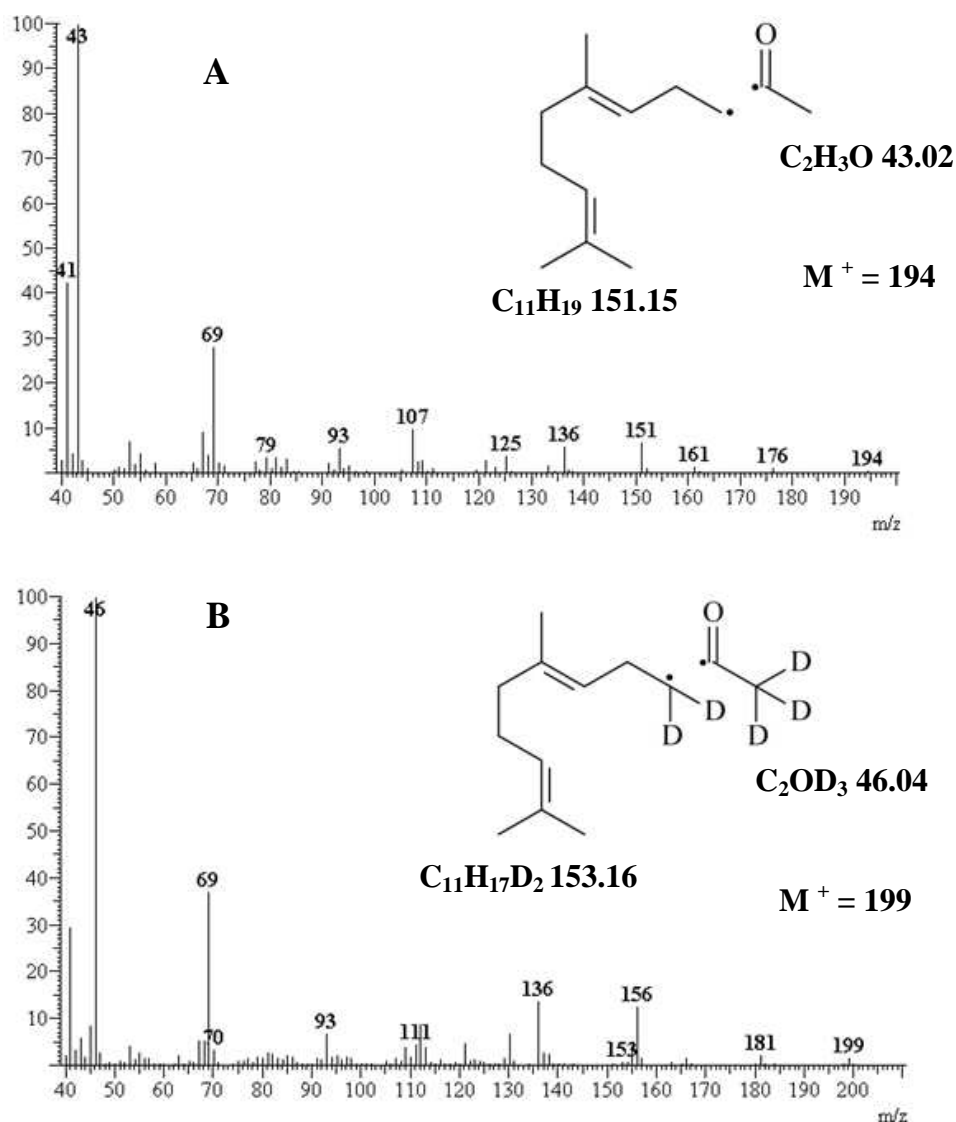


Figura 4. A) Espectro de massas normal da geranyl acetona; B) espectro de massas da geranyl acetona deuterada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi encontrada uma maior concentração do feromônio do macho de *H. betulinus* no protórax, quando comparado às outras partes do corpo ($F_{4,15} = 18,67$, $P = 0,0001$) (Figura 5). As pequenas quantidades de feromônio encontradas na cabeça, élitro, meso e metatórax e abdômen pode ser devido à contaminação durante o processo de separação das partes do corpo para a coleta do feromônio. Portanto, a fonte de feromônio parece

estar localizada no protórax dos machos de *H. betulinus*. Resultado semelhante foi observado em machos de *Neoclytus acuminatus acuminatus* (Fabricius), onde o feromônio estava presente em grande abundância no protórax, mas pequenas quantidades também estavam presentes nas outras partes (Lacey et al. 2007b). Os autores sugerem que essa pequena quantidade encontrada nas outras partes do corpo de *N. a. acuminatus* pode ser devido a contaminação das fibras de SPME durante a amostragem.

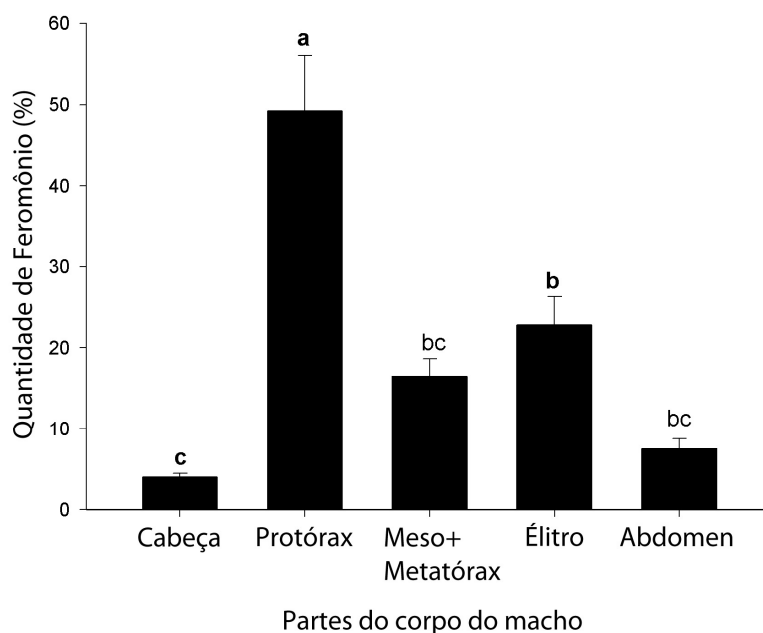


Figura 5. Porcentagem de feromônio sexual coletado das partes do corpo do macho de *H. betulinus*. Colunas seguidas de letras distintas diferem significativamente (teste Tukey; $P < 0,05$) ($n=4$).

As imagens de MEV detectaram a existência de pequenos poros distribuídos na cutícula em toda a superfície do protórax do macho (Figura 6A), mas também estavam presentes nas fêmeas (Figura 6B). Em contraste com esse resultado, muitas espécies da

subfamília Cerambycinae apresentaram poros específicos dos machos situados em depressões na cutícula do protórax e que estavam ausentes nas fêmeas, incluindo *Neoclytus mucronatus mucronatus* (Fabricius) (Lacey, et al. 2007a), *Xylotrechus nauticus* (Mannerheim), *Phymatodes lecontei* Linsley, *Neoclytus modestus modestus* (Fabricius) (Hanks et al. 2007), *N. a. acuminatus* (Lacey, et al. 2007b) e outras espécies de Cerambycinae (Ray et al. 2006). Os resultados encontrados na literatura suportam a hipótese de que a presença de poros específicos no protórax dos machos está associada com a produção do feromônio em muitas espécies da subfamília Cerambycinae (Ray et al. 2006). Parece provável que os poros encontrados no protórax do macho de *H. betulinus* também estejam associados com a produção de feromônio. Por outro lado, não se sabe qual seria a função dos poros encontrados no protórax das fêmeas de *H. betulinus*. Até o momento, nenhum estudo foi realizado para demonstrar a região onde estariam presentes as glândulas produtoras de feromônio, em espécies da subfamília Lamiinae.

Nossos resultados evidenciaram que a região onde se localizam as glândulas de produção do feromônio é o protórax. No intuito de confirmar essa região de produção e estudar a biossíntese do feromônio, iniciaram-se estudos empregando precursores deuterados.

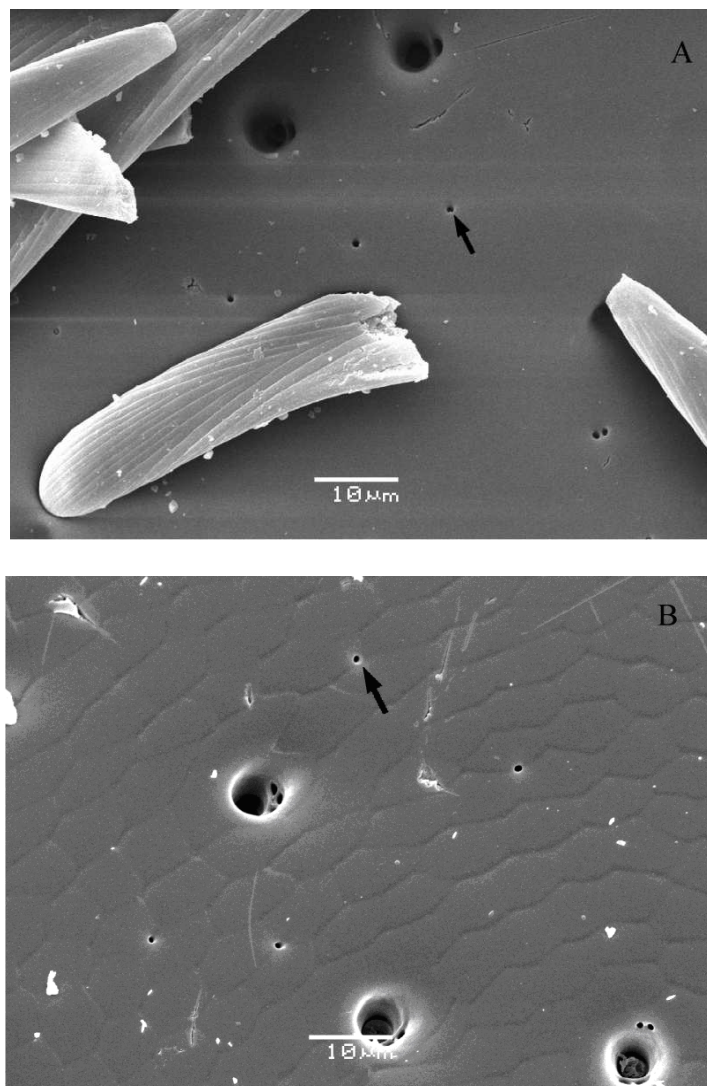


Figura 6. Imagens de MEV do protórax dos adultos de *H. betulinus*. Poros (indicados por seta) no protórax de macho (A) e fêmea (B).

Uma possível proposta biossintética para o feromônio sexual de *H. betulinus*, está representada na Figura 7. A geranil acetona **A** seria a precursora direta dos componentes **B** e **C**, os quais seriam obtidos através da redução da carbonila com posterior acetilação.

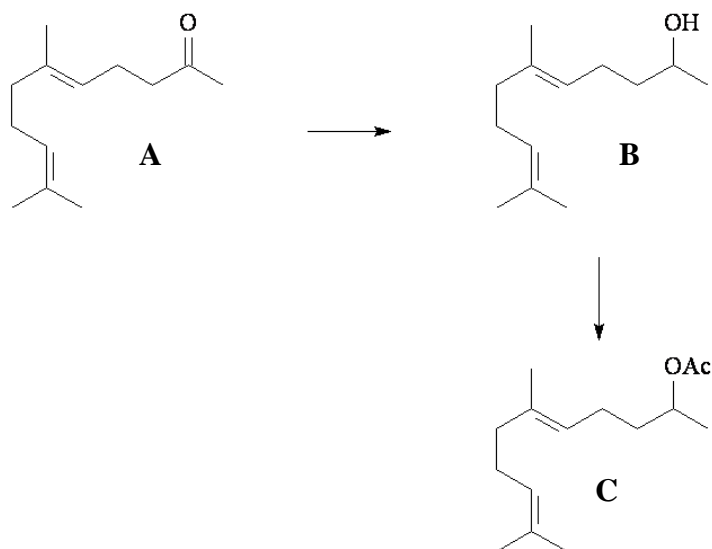


Figura 7. Biogênese para os compostos **A**, **B** e **C** do feromônio sexual do macho de *H. betulinus*.

O precursor utilizado (geranil acetona D5) foi preparado, de maneira a fazer com que os átomos de deutério, caso fossem incorporados pelo inseto, estivessem presentes no pico base do produto final desejado. Este fato é importante, pois, geralmente, a incorporação dos precursores deuterados no metabolismo dos insetos ocorre em níveis bastante baixos (Bjostad et al. 1987). Com isso, o íon molecular de um feromônio nem sempre pode ser detectado, em função das baixas quantidades em que estes são produzidos pelos insetos (Heath & Tumlinson 1984), e a análise ocorre pelo pico mais abundante do espectro.

O espectro de massas do acetato natural (composto **C**) apresenta pico base com m/z 109, estando presente nesse fragmento os cinco átomos de hidrogênio α a carbonila (Figura 8A). Entretanto, é observada uma nítida diferença no padrão de fragmentação do mesmo composto, após aplicação da geranil acetona D5. O pico observado em m/z 114 evidencia, claramente, a presença dos cinco átomos de deutério no composto (Figura 8B).

A presença do fragmento m/z 109 também é notado, porém agora em menor intensidade, em função da competição entre os dois compostos, ou seja, feromônio normal e deuterado. A presença dessas duas formas estruturais faz com que o pico base para essa mistura passe a ter m/z 69, comum às duas moléculas, e que não contém átomos de deutério (Figura 9). Esse resultado comprovou que a geranil acetona D5 foi incorporada pelo inseto e, que a biossíntese do acetato de (*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ila (composto **C**) ocorre via (*E*)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona (composto **A**), através de glândulas produtoras de feromônio localizadas no protórax do macho de *H. betulinus*.

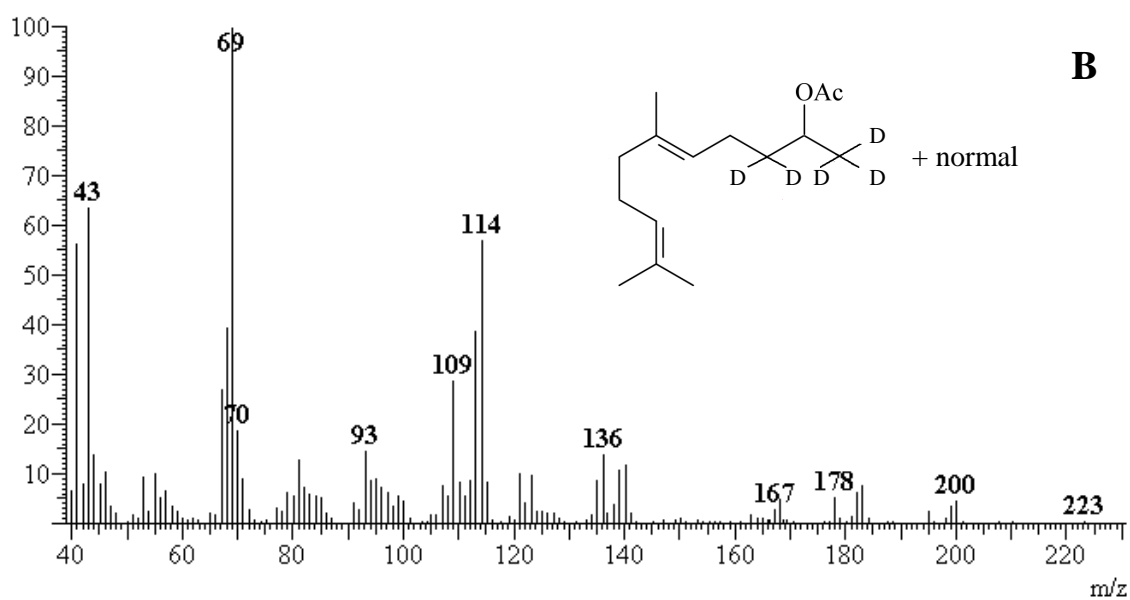
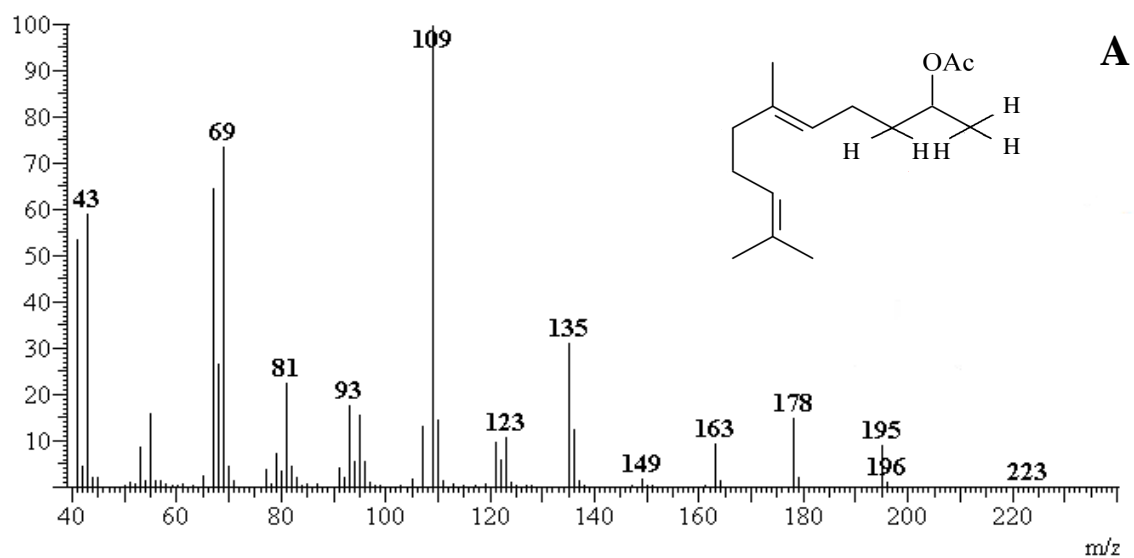


Figura 8. A – Espectro de massas do acetato normal; B – espectro de massas do acetato obtido após a aplicação do precursor, geranil acetona deuterada.

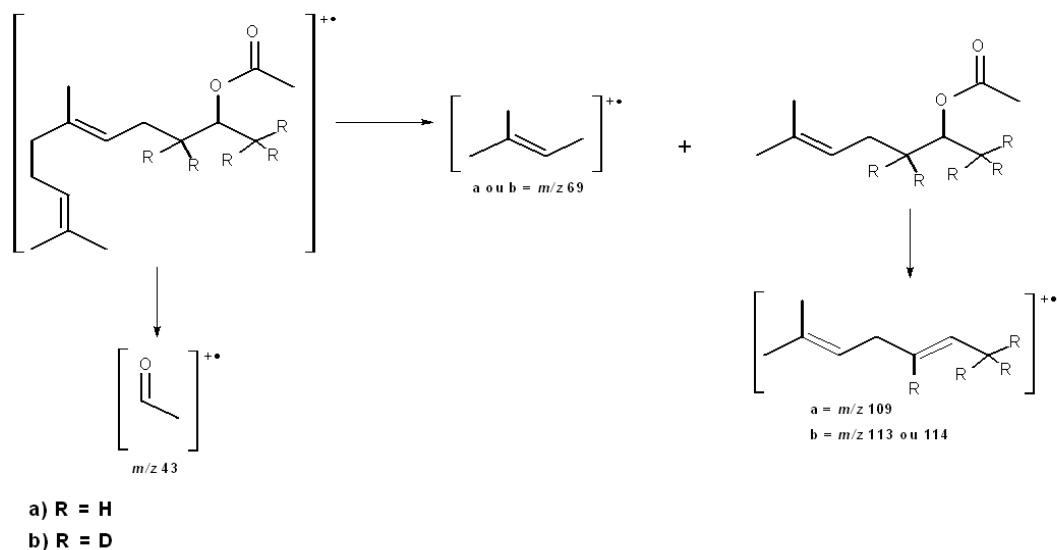


Figura 9. Padrões de fragmento para o feromônio normal e deuterado.

A comprovação definitiva que a produção e liberação do feromônio ocorrem em determinados tecidos nos insetos, vem de estudos onde o tecido isolado incorpora precursores deuterados em componentes feromonais (Tillman et al. 1999). O local da síntese do feromônio sexual ou agregação, acumulação e liberação tem sido estudado em muitas espécies de Coleoptera, e a maioria desses estudos revelaram glândulas abdomonais. Os besouros *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Anobiidae) (Levinson et al. 1983), *Bruchidius atrolineatus* (Pic) (Bruchidae) (Biemont et al. 1992), *Diabrotica virgifera* LeConte (Chrysomelidae) (Lew and Ball 1978), *Selatosomus latus* Fabricius (Elateridae) (Ivastschenko and Adamenko 1980), *Carpophilus freemani* Dobson (Nitidulidae) (Dowd & Bartelt 1993) e besouros escarabeídeos das subfamílias Melolonthinae e Rutelinae (Tada & Leal 1997) são alguns exemplos de estudos da presença de glândulas abdominais.

Apesar de vários estudos indicarem que os feromônios de diversas espécies Cerambycinae são produzidos através de glândulas localizadas no protórax do macho, estudos com biossíntese desses feromônios foram feitos até o momento, somente para

Xylotrechus pyrrhoderus Bates (Kiyota et al. 2009). Machos dessa espécie produzem (*S*)-2-hidróxi-3-octanona e (2*S*,3*S*)-2,3-octanodiol. Esses compostos foram deuterados e aplicados topicamente no protórax dos machos de *X. pyrrhoderus*, e posteriormente os voláteis foram coletados e analisados por CG-MS. Apenas a (*S*)-2-hidróxi-3-octanona deuterada foi convertida no (2*S*,3*S*)-2,3-octanodiol, indicando que a biossíntese do (2*S*,3*S*)-2,3-octanodiol ocorre via (*S*)-2-hidróxi-3-octanona (Kiyota et al. 2009).

A geranil acetona (composto **A**) é o terceiro componente mais abundante identificado no óleo essencial das folhas da erva-mate (Bastos et al. 2006). Diante disso, foi levantada a hipótese que o macho de *H. betulinus* pode estar sequestrando a geranil acetona presente na planta hospedeira e usando-a como precursora do composto **C**. O resultado encontrado no capítulo II - Figura 11 (página 63) mostrou que a produção dos compostos feromoniais dos machos de *H. betulinus* foi dependente da presença da planta hospedeira. Na presença de ramos da erva-mate os machos liberaram significativamente mais voláteis que os machos na ausência da planta. Esse resultado suporta a hipótese de que os machos sequestram a geranil acetona presente na planta hospedeira durante a alimentação e a usam como precursora para a produção do feromônio.

Estudos mostram que alguns insetos adquirem compostos químicos da planta hospedeira e os usam como feromônios sexuais ou precursores de feromônio (Reddy & Guerrero 2004). Em muitas espécies de coleópteros, principalmente escolitídeos, a síntese do feromônio nos machos é estimulada pela alimentação na árvore hospedeira (Wood 1982, Borden 2003). Certas espécies de escolitídeos são conhecidas por produzir feromônios terpenóides a partir dos terpenos da planta hospedeira. Estudos iniciais da biossíntese do feromônio de agregação em *Ips paraconfusus* Lanier demonstraram que os feromônios atrativos, ipsenol e ipsdienol, foram produzidos pelos machos que foram expostos ao mirceno (Hughes & Renwick 1997). Hendry et al. (1980) confirmaram essa

conclusão, quando demonstraram a conversão do ^2H -mirceno para ^2H -ipsenol e ^2H -ipsdienol nos machos de *I. paraconfusus*. Os machos de *Dendroctonus ponderosae* Hopkins (Coleoptera: Scolytidae) usam α -pineno das árvores hospedeiras como um precursor para a produção de feromônio *trans*-verbenol (Hughes 1973). Outro exemplo de síntese de feromônio a partir de precursores da planta hospedeira em Coleoptera inclui o besouro *Anthonomus grandis* Boheman (Curculionidae). Estudos com biossintéticos mostraram que os terpenóides geraniol e nerol servem como precursores do feromônio dessa espécie (Thompson & Mitlin 1979). Os ácidos graxos e terpenóides são as duas maiores classes que atuam como precursores biossintéticos sob a ação de um complexo enzimático para a formação dos feromônios em muitas espécies de coleópteros (Tillman et al. 1999).

Os resultados obtidos neste capítulo comprovaram que a geranil acetona deuterada foi incorporada pelos machos e é utilizada como precursora no processo biossintético para produção do feromônio sexual do macho de *H. betulinus*. Adicionalmente, mostrou-se que a biossíntese desse feromônio ocorre no protórax do macho, muito provavelmente, sendo liberado através dos poros encontrados na superfície do protórax.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayres, M., Ayres, M. Jr., Ayres, D. L. & Santos, A. S. 2003. BioEstat3.0, Aplicações estatística nas áreas das ciências biológicas e médicas, Sociedade Civil Mamirauá, Belém, Brasil, 290p.
- Bastos, D. H. M., Ishimoto, E. Y., Marques, M. O. M., Ferri, A. F. & Torres, E. A. F. S. 2006. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. Journal of Food Composition and Analysis 19: 538 - 543.
- Biemont, J. C., Chaibou, M. & Pouzat, J. 1992. Localization and fine structure of the female sex pheromone-producing glands in *Bruchidius atrolineatus* (Pic) (Coleoptera: Bruchidae). J. Insect Morphol. and Embryol. 21: 251 - 262.
- Bjostad, L. B., Wolf, W. A. & Roelofs, W. L. 1987. Pheromone biosynthesis in Lepidopterans: Desaturation and chain Shortening, pp. 77-120. In: G. D. Prestwich, G. J. Blomquist (eds.) Pheromone Biochemistry, Academic Press, Inc. London.
- Borden, J. H. 2003. Strategies and tactics for the use of semiochemicals against forest insect pests in North America, pp. 265-279. In: Lumsden, R.D, Vaughn, J. L. (eds.) Pest management: Biologically based technologies. Washington, DC: Am. Chem. Soc.
- Brandão Filho, J. S. 1945. Uma broca do mate. Boletim Agrícola Secção Formação Agrícola. Curitiba, 3: 55 - 58.

- Cassanello, A. M. L. 1993. Ciclo de vida e aspectos morfológicos de *Hedypathes betulinus* (Klug, 1825) (Coleoptera, Cerambycidae, Lamiinae), broca-da-erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Dissertação de Mestrado, Entomologia. Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, UFPR.
- Dowd, P. F. & Bartelt, R. J. 1993. Aggregation pheromone gland of *Carpophilus freemani* (Coleoptera: Nitidulidae) and gland distribution among other sap beetles. *Ann. Ent. Soc. Am.* 86: 464 - 469.
- Fonseca, M.G. & Zarbin, P.H.G. 2009. Mating behaviour and evidence for sex-specific pheromones in *Hedypathes betulinus* (Coleoptera: Cerambycidae: Lamiinae). *J. Appl. Entomol.* 133: 695 - 701.
- Gäbler, A. & Boland, W. 1991. Stereochemical studies on homoterpene biosynthesis in higher plants; mechanistic, phylogenetic, and ecological aspects. *Helvetica Chimica Acta* 74: 1773 - 1789.
- Hanks, L. M., Millar, J. G., Moreira, J. A., Barbour, J. D., Lacey, E. S., Mcelfresh, J. S., Reuter, F. R. & Ray, A. M. 2007. Using generic pheromone lures to expedite identification of aggregation pheromones for the cerambycid beetles *Xylotrechus nauticus*, *Phymatodes lecontei*, and *Neoclytus modestus modestus*. *J. Chem. Ecol.* 33:889 - 907.

- Heath, R. R. & Tumlinson, J. H. 1984. Techniques for purifying analyzing, and identifying pheromones, pp. 287-322. In: H. E. Hummel, T. A. Miller (eds.) Techniques in Pheromones Research, Spring-Verlag, Tokyo.
- Hendry, L. B., Piatek, B., Browne, L. E., Wood, D. L., Byer, J. A., Fish, R. H. & Hicks, R.A. 1980. In vivo conversion of a labelled host plant chemical to pheromone of the bark beetle, *Ips paraconfusus*. Nature 284, 485.
- Hughes, P. R. 1973. Effect of alpha-pinene exposure on trans-verbenol synthesis in *Dendroctonus ponderosae* Hopkins. Naturwissenschaften 60: 261 - 262.
- Hughes, P. R. & Renwick, J. A. A. 1997. Neural and hormonal contro of pheromone biosynthesis in the bark beetle, *Ips paraconfusus*. Physiol. Entomol. 2: 117 - 123.
- Ivastschenko, I. I. & Adamenko, E. A. 1980. Place of pheromone formation in females of *Selatosomus latus* (Coleoptera: Elateridae). Zoologicheski Zhurnal 59: 225 - 228.
- Kiyota, R., Yamakawa, R., Iwabuchi, K., Hoshino, K. & Ando, T. 2009. Synthesis of the deuterated sex pheromone components of the grape borer, *Xylotrechus pyrrhoderus*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73: 2252 - 2256.
- Lacey, E. S., Moreira, J. A., Millar, J.G., Ray, A. M. & Hanks, L. M. 2007 a. Male-produced aggregation pheromone of the cerambycid beetle *Neoclytus mucronatus mucronatus*. Entomol. Exp. Appl. 122:171 - 179.

- Lacey, E.S., Ray, A. M. & Hanks, L. M. 2007 b. Calling behavior of the cerambycid beetle *Neoclytus acuminatus acuminatus* (F.). J. Insect. Behav. 20: 117 - 127.
- Levinson, H. Z., Levinson, A. R., Kahn, G. E. & Schafer, K. 1983. Occurrence of a pheromone-producing gland in female tobacco beetles. Experientia 39: 1095 - 1097.
- Lew, A. C. & Ball, H. J. 1978. The structure of the apparent pheromone-secreting cells in female *Diabrotica virgifera*. Ann. Ent. Soc. Am. 71: 685 - 688.
- Mazuchowski, J. Z. 1991. Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). Curitiba: Emater, pp. 104.
- Ray, A. M., Lacey, E. S. & Hanks, L. M. 2006. Predicted taxonomic patterns in pheromone production by longhorned beetles. Naturwissenschaften 93:543 - 550.
- Reddy, G. V. & Guerrero, A. 2004. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. Trends in Plant Science 9: 253 - 261.
- Tada, S. & Leal, W. S. 1997. Localization and morphology of sex pheromone glands in scarab Beetles. J. Chem. Ecol. 23: 903 - 915.
- Thompson, A. C. & Mitlin, N. 1979. Biosynthesis of the sex pheromone of the male boll weevil from monoterpene precursors. Insect Biochem. 9: 293 - 294.

- Tillman, J. A., Seybold, S. J., Jurenka, R. A. & Blomquist, G. J. 1999. Insect pheromones – an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 481 - 514.
- Wood, D. L. 1982. The role of pheromone, Kairomones, and allomones in the host selection and colonization behavior of bark Beetles. *Ann. Rev. Entomol.* 27: 411 - 446.
- Zarbin, P. H. G., Ferreira, J. T. B. & Leal, W. S. 1999. Metodologias gerais empregadas no isolamento e identificação estrutural de feromônio de insetos. *Química Nova* 22: 263 - 268.
- Zarbin, P. H. G. 2001. Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos, pp. 45-50. In: *Feromônio de Insetos: Biologia, Química e Emprego no Manejo de Pragas* 2nd ed. Ed by Vilela, E. F., Della-Lucia, M. C, Holos, Ribeirão Preto.

CONCLUSÕES GERAIS

No presente trabalho foi possível verificar que a comunicação entre *H. betulinus* é mediada pela combinação de um feromônio sexual produzido pelo macho e um feromônio de contato produzido pela fêmea.

Análises cromatográficas dos voláteis obtidos de machos e fêmeas de *H. beutulinus* revelaram a existência de três compostos macho-específicos. Os três compostos macho-específicos foram identificados como o acetato de (R)-(-)-(E)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ila, e dois componentes minoritários, o (E)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona e o (R)-(-)-(E)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ol.

A liberação desses compostos é dependente do fotoperíodo e da presença da planta hospedeira. A liberação ocorreu principalmente durante a fotofase, mostrando um pico entre a 4 e 6 h. A quantidade dos compostos diferiu quando os voláteis foram coletados na presença e ausência da planta hospedeira. Esses resultados foram essenciais para determinar o horário ideal para realizar os testes comportamentais e otimizar a coleta dos voláteis liberados pelos adultos de *H. betulinus* no laboratório.

Em bioensaios de olfatômetro, o composto majoritário racêmico ((E)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ila) combinado com voláteis da planta hospedeira ou a mistura ternária racêmica em uma dosagem maior, combinada ou não com voláteis da planta hospedeira, atraiu significativamente as fêmeas. Estes resultados abriram perspectiva para o uso do feromônio sexual do macho no manejo integrado de *H. betulinus*. São necessários estudos para conhecer quais os compostos liberados pela planta hospedeira envolvidos no processo de comunicação de *H. betulinus*.

O potencial deste feromônio é evidente, entretanto são necessários estudos futuros para testar esses compostos sintéticos no campo, bem como investigar o tipo, cor, altura

e distância entre as armadilhas e determinar a dose ideal de feromônio a ser utilizada no liberador. Com base nos resultados de campo obtidos será possível utilizar o feromônio sexual do macho no manejo integrado de *H. betulinus*. Com isso, o controle mecânico, através da catação dos adultos poderá ser substituído por armadilhas com feromônio, e assim diminuir a mão-de-obra utilizada na catação dos insetos durante os meses de ocorrência do inseto no campo.

Foi iniciado um estudo para localizar as glândulas produtoras do feromônio no macho. Nos resultados iniciais, foi evidenciado que as glândulas produtoras de feromônio estão localizadas no protórax do macho de *H. betulinus* e o feromônio seria liberado através dos poros encontrados nessa região.

Com a incorporação da geranil acetona deuterada pelos machos, confirmou-se que as glândulas produtoras do feromônio estão localizadas no protórax. Outro fato observado é que geranil acetona é utilizada como precursora para produção do feromônio, e que *H. betulinus* pode seqüestrar a geranil acetona da planta hospedeira para utilização como precursora para a produção do feromônio sexual.

Os resultados obtidos neste trabalho são de grande importância, porque deram início ao estudo da ecologia química da broca-da-erva-mate, *H. betulinus*. Este trabalho abre uma grande perspectiva para o desenvolvimento de uma metodologia mais eficiente e efetiva para o controle desta praga, e com grande possibilidade dessa tecnologia ser transferida para os produtores de erva-mate da região Sul do País.